República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0913137-0 A2

(22) Data do Depósito: 16/09/2009

(43) Data da Publicação Nacional: 11/08/2020

(54) Título: MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UM PRODUTO QUÍMICO E APARELHO DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA

(51) Int. Cl.: C12P 1/00; C12M 1/00; C12M 3/00; C12N 15/09.

(30) Prioridade Unionista: 30/09/2008 JP 2008-252723; 30/09/2008 JP 2008-252724.

(71) Depositante(es): TORAY INDUSTRIES, INC.

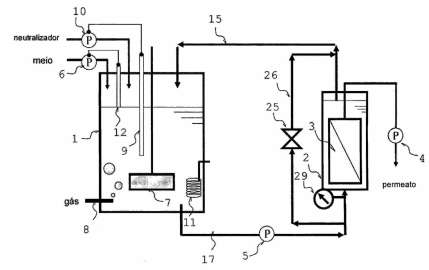
(72) Inventor(es): TAKASHI MIMITSUKA; HIDEKI SAWAI; KATSUSHIGE YAMADA; KEN MORITA; KENJI SAWAI; KENTARO ISHII; MASASHI HIGASA; SHINICHI MINEGISHI.

(86) Pedido PCT: PCT JP2009066119 de 16/09/2009

(87) Publicação PCT: WO 2010/038613 de 08/04/2010

(85) Data da Fase Nacional: 28/02/2011

(57) Resumo: MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UM PRODUTO QUÍMICO E APARELHO DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA. A presente invenção está relacionada ao controle da velocidade de fluxo de um Líquido de cultura no interior de um tanque de separação por membrana, sem influenciar as condições de cultura no tanque de fermentação, e também a impedir a precipitação de microrganismos ou de células em cultura, de modo tal que possa ser aumentada a eficiência de produção do produto químico em um método para a produção de um produto químico incluindo as etapas de: cultura de microorganismos ou células em cultura em um tanque de fermentação; transferência do liquido de cultura do tanque de fermentação para um tanque de separação por membrana, de modo a se filtrar o liquido de cultura através de uma membrana de separação; e coleta de um produto de fermentação de um líquido de filtração como produto químico, fazendo-se refluir o líquido de cultura que não foi filtrado para ser acrescentado ao líquido de cultura de um lado a montante do tanque de separação por membrana, faz-se desviar uma porção do Líquido de cultura a ser transferido do tanque de fermentação do tanque de separação por membrana, dependendo de (...).



"MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UM PRODUTO QUÍMICO E APARELHO DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA"

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere a um método para a produção de um produto químico com a utilização da cultura de microorganismos ou células em cultura. Mais especificamente, a presente invenção se refere a um método para a produção de um produto químico e a um aparelho para fermentação em que, enquanto se efetuar a cultura, um líquido contendo um produto de fermentação (produto químico) produzido pela cultura é eficientemente filtrado de um líquido de cultura contendo microorganismos ou células em cultura através de uma membrana de separação para coletar o produto de fermentação de modo que o produto químico desejado seja produzido com um alto grau de produtividade.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O método que produz o material referente à cultura de microorganismos ou células em cultura é principalmente classificado em (1) método de cultura em bateladas e método de cultura com alimentação de bateladas, assim como (2) método de fermentação contínua.

No método de cultura em bateladas e no método de cultura com alimentação de bateladas de (1) mencionados acima há vantagens no fato de que a cultura pode ser completada usando-se somente uma instalação simples durante um período curto de tempo, sendo pouco o dano causado por contaminação bacteriana. Por este motivo, estes métodos vêm sendo convencionalmente usados como um método de produção de substâncias utilizando microorganismos ou células em cultura. No entanto, nestes métodos, como a concentração do produto de fermentação em um líquido de cultura se torna cada vez mais elevada com o decorrer do tempo, a produtividade e o rendimento são reduzidos, por um aumento da pressão osmótica, por exemplo,

ou com a inibição da fermentação devida ao produto propriamente dito. Por estes motivos estes métodos de cultura tornam difícil se manter a produtividade e o rendimento de um produto de fermentação a um nível estável alto durante um período de tempo prolongado.

Por outro lado, o método de fermentação contínua do item (2) acima é caracterizado pelo fato de que, impedindo-se o acúmulo do produto de fermentação em um tanque de fermentação com uma alta concentração, a produtividade e o rendimento podem ser mantidos a um nível elevado durante o período prolongado.

Um método de fermentação contínua foi divulgado, por exemplo, no tocante à fermentação do ácido L-glutâmico (veja Documento Patentário 1) e L-lisina (veja Documento Não Patentário 1). No entanto, nestes exemplos, embora materiais, tais como nutrientes, sejam continuamente fornecidos ao líquido de cultura, o líquido de cultura contendo microorganismos ou células em cultura é também aspirado, de modo que os microorganismos ou células em cultura no líquido de cultura são diluídos; portanto, o aumento da sua eficiência de produção é limitado.

Por este motivo como o método de fermentação contínua, foi proposto um método em que microorganismos ou células em cultura são filtrados através de uma membrana de separação e enquanto o produto de fermentação é coletado de um líquido de filtração, os microorganismos ou células em cultura filtrados são conservados no tanque de fermentação ou se faz os mesmos refluir para lá para manter a concentração dos microrganismos ou células no líquido de cultura a um nível alto.

Foi proposta uma técnica, por exemplo, em que a fermentação contínua é conduzida usando-se um aparelho para a fermentação contínua com uma membrana de separação (veja Documento Patentário 2). Nesta proposta, um aparelho para a fermentação contínua, dotado com um tanque

usado para a cultura de microorganismos ou de células em cultura e um tanque usado para a separação por membrana sobre um produto de fermentação alvo dos microorganismos e das células em cultura no líquido de cultura, é usado de modo tal, que diversos produtos químicos podem ser produzidos a uma velocidade de produção mais elevada em comparação com o método de cultura em bateladas e com o método de cultura de alimentação de bateladas.

No aparelho para a fermentação contínua que utiliza uma membrana de separação, pensa-se que, aumentando-se a velocidade de fluxo do líquido de cultura no interior de um tanque de separação por membrana, faz-se com haja uma menor contaminação da membrana; por este motivo, pode ser aumentada a velocidade de produção devido ao aumento na quantidade de líquido de filtração através da membrana de separação.

No Documento Patentário 2, no entanto, como a quantidade de transferência de líquido do tanque de fermentação e a quantidade de fluxo para dentro do tanque se separação por membrana não pode ser controladas separadamente, a quantidade de fluxo do líquido de cultura a ser fornecido ao tanque de separação por membrana depende da quantidade de fluxo do líquido de cultura transferido do tanque de fermentação. Portanto, em uma tentativa de se alterar a velocidade de fluxo do líquido de cultura no interior do tanque de separação por membrana, a quantidade de transferência de líquido do tanque de fermentação precisa ser alterada, resultando que um estado de mistura do líquido no interior do tanque de fermentação é alterado para produzir graves alterações das condições de cultura. Além disso, no caso em que a pressão no interior do tanque de separação por membrana foi aumentada devido à contaminação da membrana ou ao aumento na concentração de microorganismo ou de células em cultura com o decorrer do tempo, e semelhantes, é preferível se reduzir a quantidade de fluxo do líquido de cultura a ser fornecida ao tanque de separação por membrana a fim de se otimizar a

separação por membrana propriamente dita. No entanto, quando a quantidade de fluxo do líquido de cultura a ser fornecido ao tanque de separação por membrana for alterada, as condições de cultura no tanque de fermentação serão muito alteradas. Por este motivo, a quantidade de fluxo do líquido de cultura a ser fornecida ao tanque de separação por membrana não pode ser alterada facilmente. Além disso, no caso em que a quantidade do líquido de cultura a ser transferida do tanque de fermentação for reduzida para controlar de modo ótimo a pressão no interior do tanque de separação por membrana, a velocidade de fluxo do líquido de cultura no interior de uma linha de transferência de líquido será reduzida e os microorganismos ou células em cultura se precipitam no interior da linha de transferência de líquido, e ocorre um problema de redução da eficiência de produção. Por outro lado, quando a pressão no interior do tanque de separação por membrana for demasiado alta, os microorganismos no líquido de cultura transferidos para fora do tanque de separação por membrana poderiam ser danificados devido à flutuação da pressão.

DOCUMENTOS DO ESTADO DA TÉCNICA

Documentos Patentários

Documento Patentário 1: JP-A No. 10-150996

Documento Patentário 2: Panfleto de Publicação internacional No. 07/097260

Documentos Não Patentário

Documento Não Patentário 1: Toshihiko Hirao *et al.*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 32, 269-273 (1989)

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

PROBLEMAS A SEREM RESOLVIDOS PELA INVENÇÃO

Levando-se em conta estas circunstâncias, um objetivo da presente invenção consiste na proposição de um método para a produção de

um produto químico, que pode controlar a velocidade de fluxo de um líquido de cultura no interior de um tanque de separação por membrana sem influenciar as condições de cultura no tanque de fermentação e também eliminar a precipitação de microorganismos ou células em cultura de modo que possa ser aumentada a eficiência de produção do produto químico, assim como de um aparelho de fermentação ao qual tal método possa ser, de preferência, aplicado.

MEIOS PARA A SOLUÇÃO DOS PROBLEMAS

Os inventores da presente invenção conduziram estudos extensos sobre o aparelho de fermentação contínua utilizando uma membrana de separação para aumentar a velocidade de produção e estabilizar a cultura de fermentação, e como resultado, os inventores revelaram que, usando-se qualquer uma da(s) estrutura(s) (1) a (14) abaixo, é possível se conservar as condições de cultura adequadamente (tempo de retenção do líquido de cultura e assim por diante), controlando-se ao mesmo tempo a velocidade de fluxo do líquido de cultura no interior de um tanque de separação por membrana e consequentemente produzir eficientemente um produto químico, e assim completar a presente invenção.

(1) Um método para a produção de um produto químico incluindo as etapas de: cultura de microorganismos ou de células em cultura em um tanque de fermentação; transferência de um líquido de cultura do tanque de fermentação para um tanque de separação por membrana de modo a filtrar o líquido de cultura através de uma membrana de separação; e coleta de um produto de fermentação a partir de um líquido de filtração como o produto químico, enquanto se faz refluir um líquido de cultura que não foi filtrado de modo a ser acrescentado ao líquido de cultura em um lado a montante do tanque de separação por membrana, em que uma porção do líquido de cultura a ser transferido do tanque de fermentação seja desviada do

tanque de separação por membrana dependendo de uma pressão do lado do influxo do líquido de cultura do tanque de separação por membrana.

(2) O método para a produção de um produto químico de acordo com o item (1) acima, em que se permite que uma quantidade de fluxo do líquido de cultura seja desviada do tanque de separação por membrana, é controlada de tal modo que a pressão manométrica no lado de influxo do líquido de cultura do tanque de separação por membrana é ajustada para 1 MPa ou menos.

(3) O método para a produção de um produto químico de acordo com o item (1) ou (2) acima, em que uma porção do líquido de cultura que não foi filtrado seja refluída de modo a ser acrescentada ao líquido de cultura no tanque de fermentação, enquanto o resto da porção do líquido de cultura que não foi filtrado é refluído de modo a ser acrescentado a um líquido de cultura localizado entre o tanque de fermentação e o tanque de separação por membrana.

(4) O método para a produção de um produto químico de acordo com o item (3) acima, em que uma quantidade de fluxo do líquido de cultura que não foi filtrado e que será refluído de modo a ser acrescentada ao líquido de cultura localizado entre o tanque de fermentação e o tanque de separação por membrana e uma quantidade de fluxo do líquido de cultura que não foi filtrado e que será refluído de modo a ser acrescentada ao líquido de cultura no tanque de fermentação sejam independentemente controladas.

(5) O método para a produção de um produto químico, de acordo com o item (3) ou (4) acima, em que uma relação de uma quantidade de fluxo do líquido de cultura que não foi filtrado e que será refluído de modo a ser acrescentada ao líquido de cultura no tanque de fermentação para uma quantidade de fluxo do líquido de cultura que não foi filtrado e que será refluído de modo a ser acrescentada ao líquido de cultura localizado entre o tanque de

fermentação e o tanque de separação por membrana é ajustado para 1 ou menos.

(6) O método para a produção de um produto químico de acordo com qualquer um dos itens (1) a (5) acima, em que cada uma dentre a velocidade linear do líquido de cultura a ser transportado do tanque de fermentação para o tanque de separação por membrana, a velocidade linear do líquido de cultura que não foi filtrado que será refluído do tanque de separação por membrana de modo a ser acrescentada ao líquido de cultura do lado a montante do tanque de separação por membrana e a velocidade linear do líquido de cultura que se permite que seja desviado do tanque de separação por membrana é ajustada para 2,5 cm/seg ou mais.

(7) O método para a produção de um produto químico de acordo com qualquer um dos itens (1) a (6) acima, em que uma quantidade do líquido de cultura a fluir para dentro do tanque de separação por membrana e/ou a quantidade de líquido de filtração proveniente da membrana de separação são ajustadas de modo tal, que a porcentagem de recuperação da quantidade de líquido de filtração proveniente da membrana de separação para a quantidade de líquido de cultura para fluir para dentro do tanque de separação por membrana é ajustada para 10,0% ou menos.

(8) O método para a produção de um produto químico de acordo com qualquer um dos itens (1) a (7) acima, em que uma relação do volume do líquido de cultura no tanque de fermentação para o volume de líquido de cultura no tanque de separação por membrana é ajustada a uma faixa de 4 ou mais até 100 ou menos.

(9) Um aparelho de fermentação contínua incluindo: um tanque de fermentação para cultivar microorganismos ou células em cultura; um tanque de separação por membrana que tem uma membrana de separação usada para coletar um produto de fermentação produzido em um líquido de

cultura proveniente do tanque de fermentação; uma linha de circulação que conecta o tanque de fermentação com o tanque de separação por membrana de modo a transferir o líquido de cultura para o tanque de separação por membrana, e fazer refluir um líquido de cultura que não foi filtrado através da membrana de separação de modo a ser acrescentada ao líquido de cultura do lado a montante do tanque de separação por membrana; e meios de transferência de líquido de cultura instalados na linha de circulação, incluindo esta estrutura ainda uma linha de desvio para o tanque de separação por membrana; meios de detecção para uma pressão do lado do influxo do líquido de cultura do tanque de separação por membrana; e meios de controle da quantidade de fluxo instalados na linha de desvio.

(10) O aparelho de fermentação contínua de acordo com o item (9) acima em que os meios de controle da quantidade de fluxo são operados em resposta ao resultado de detecção dos meios de detecção.

(11) O aparelho de fermentação contínua de acordo com os itens (9) ou (10) mencionados acima, incluindo ainda meios de detecção de velocidade linear para a linha de circulação, de modo que os meios de controle da quantidade de fluxo e/ou os meios de transferência do líquido de cultura sejam operados em resposta ao resultado da detecção dos meios de detecção da velocidade linear.

(12) O aparelho de fermentação contínua de acordo com qualquer um dos itens (9) a (11) acima, em que o tanque de separação por membrana é ajustado em um circuito de circulação que tem meios de transferência de líquido diferentes dos meios de transferência do líquido de cultura que é independente do tanque de fermentação.

(13) O aparelho de fermentação contínua de acordo com qualquer um dos itens (9) a (12) acima, em que a linha de circulação tem uma abertura em uma posição que está imersa com o líquido de cultura a ser

armazenado no tanque de fermentação.

(14) O aparelho de fermentação contínua de acordo com qualquer um dos itens (9) a (13) acima, em que a relação do volume do tanque de fermentação para o volume do tanque de separação por membrana é ajustada a uma faixa de 4 ou mais a 100 ou menos.

EFEITOS DA INVENÇÃO

De acordo com a presente invenção, é permitido que uma porção do líquido de cultura a ser transferida do tanque de fermentação seja desviada do tanque de separação por membrana dependendo de uma pressão no lado do influxo do líquido de cultura do tanque de separação por membrana, isto é, a quantidade de fluxo do líquido de cultura a ser fornecido ao tanque de separação por membrana e a quantidade de fluxo do líquido de cultura a ser transferido do tanque de fermentação podem ser controladas independentemente. Por este motivo é possível se fazer com que praticamente não ocorra nenhuma contaminação da membrana alterando-se de modo adequado a velocidade de fluxo do líquido de cultura no interior do tanque de separação por membrana sem alterar as condições de cultura e, consequentemente, aumentar a quantidade do líquido de filtração e melhorar a velocidade de produção. Mesmo que ocorra uma contaminação da membrana com o decorrer do tempo ou que o aumento da concentração dos microorganismos ou de células em cultura faça a pressão aumentar a pressão no interior do tanque de separação por membrana, é possível se transferir o líquido de cultura para o tanque de separação por membrana, sem produzir praticamente nenhuma alteração das condições de cultura no tanque de fermentação, e também é possível se controlar a quantidade de fluxo do líquido de cultura a ser fornecida ao tanque de separação por membrana, a pressão exercida no tanque de separação por membrana, mantendo ao mesmo tempo uma velocidade de fluxo que praticamente não faz nenhum microorganismo ou

célula em cultura se precipitar na linha de circulação usada para o refluxo do líquido de cultura que não foi filtrado pela membrana de separação, e consequentemente, é possível se impedir danos ao tanque de separação por membrana e também impedir a destruição dos microorganismos ou células em cultura no líquido de cultura devida a flutuações de pressão. Além disso, mesmo que ocorra uma falha no interior do tanque de separação por membrana, é possível se interromper completamente o fornecimento do líquido de cultura ao tanque de separação por membrana e corrigir a falha no interior do tanque de separação por membrana, e se trocar ou comutar tanques de separação por membrana, conduzindo-se ao mesmo tempo a fermentação contínua.

Além disso, na presente invenção, controlando-se a porcentagem de recuperação do líquido de filtração no tanque de separação por membrana até 10% ou menos, permitindo-se que uma porção do líquido de cultura a ser transferido do tanque de fermentação seja desviada do tanque de separação por membrana dependendo da pressão do lado do influxo do líquido de cultura do tanque de separação por membrana, torna-se possível se evitar ainda mais a contaminação da membrana e prolongar um tempo de fermentação contínua.

Conforme foi descrito acima, de acordo com a presente invenção, pode ser simultaneamente melhorada a eficiência de produção e o rendimento associado com açúcar do produto de fermentação obtido pela fermentação contínua (isto é, um produto desejado), e controlando-se ainda mais a porcentagem de recuperação no tanque de separação por membrana até 10% ou menos, pode também ser prolongado o tempo de fermentação contínua.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 é uma vista esquemática em esboço que explica uma modalidade de um aparelho de fermentação contínua de acordo com a presente invenção.

A Figura 2 é uma vista esquemática em esboço que explica outra modalidade do aparelho de fermentação contínua de acordo com a presente invenção.

A Figura 3 é um desenvolvimento esquemático que explica modalidade de um elemento de membrana de separação usado na presente invenção.

A Figura 4 é uma vista esquemática em perspectiva que explica outra modalidade do elemento de membrana de separação usado na presente invenção.

A Figura 5 é uma ilustração que mostra um MPa físico de um vetor de expressão de levedura pTRS11 usado em um exemplo de referência.

A Figura 6 é um desenho que mostra uma velocidade de fluxo linear do líquido de cultura no interior de uma linha de circulação e uma quantidade de bactérias que se precipitou no interior da linha, obtida no exemplo 2.

A Figura 7 é uma vista esquemática em esboço que explica outra modalidade do aparelho de fermentação contínua de acordo com a presente invenção.

A Figura 8 é uma vista esquemática em esboço que explica outra modalidade do aparelho de fermentação contínua de acordo com a presente invenção.

A Figura 9 é uma vista esquemática em esboço que explica um modo de um aparelho de fermentação contínua usado em exemplos comparativos.

A Figura 10 é um desenho que mostra uma concentração de ácido láctico e uma turvação de levedura obtida no exemplo 1.

A Figura 11 é um desenho que mostra uma concentração de ácido láctico e uma turvação de levedura obtida em exemplo comparativo 1.

A Figura 12 é um desenho que mostra uma pressão de um líquido de cultura no lado do influxo de um tanque de separação por membrana, obtido no exemplo comparativo 1.

A Figura 13 é uma vista esquemática em esboço que explica um modo de um aparelho de fermentação contínua usado no exemplo comparativo.

A Figura 14 é uma vista esquemática em esboço que explica ainda uma outra modalidade do aparelho de fermentação contínua de acordo com a presente invenção.

A Figura 15 é uma vista esquemática em esboço que explica um modo de um aparelho de fermentação contínua usado nos exemplos comparativo.

A Figura 16 é uma vista esquemática em esboço que explica a outra modalidade do aparelho de fermentação contínua de acordo com a presente invenção.

A Figura 17 é um desenho que mostra uma transição de diferenças de pressão transmembrana obtidas nos exemplos 6 a 9.

A Figura 18 é um desenho que mostra uma concentração de cadaverina e uma turvação de bactérias corineformes obtida no exemplo 10.

A Figura 19 é um desenho que mostra uma concentração de cadaverina e uma turvação de bactérias corineformes obtida no exemplo comparativo 5.

A Figura 20 é um desenho que mostra uma pressão de um líquido de cultura do lado do influxo de um tanque de separação por membrana obtida no exemplo comparativo 5.

A Figura 21 é um desenho que mostra uma concentração de L-lisina e uma turvação de bactérias corineformes obtida no exemplo 11.

A Figura 22 é um desenho que mostra uma concentração de L-lisina e uma turvação de bactérias corineformes obtida no exemplo comparativo 6.

A Figura 23 é um desenho que mostra uma pressão de um líquido de cultura do lado do influxo de um tanque de separação por membrana obtida no exemplo comparativo 6.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

O MELHOR MODO PARA A IMPLEMENTAÇÃO DA INVENÇÃO

Um método da presente invenção se refere a um método pra a produção de um produto químico, em que microorganismos ou células em cultura são cultivados em um tanque de fermentação, e o líquido de cultura é continuamente transferido do tanque de fermentação para um tanque de separação por membrana de modo a ser filtrado através de uma membrana de separação de modo que um produto de fermentação seja coletado do líquido de filtração como um produto químico, ao passo que se faz refluir o líquido de cultura que não foi filtrado de modo a ser acrescentada ao líquido de cultura de um lado a montante do tanque de separação por membrana, e nesta ocasião, permite-se que uma porção do líquido de cultura transferida do tanque de fermentação seja desviada do tanque de separação por membrana em resposta a uma pressão do líquido de cultura do lado de influxo do tanque de separação por membrana.

A presente invenção é executada por um aparelho de fermentação, conforme mostrado, por exemplo, na Figura 1. A Figura 1 é uma vista esquemática em esboço mostrando um aparelho de fermentação de acordo com uma modalidade da presente invenção.

O aparelho de fermentação mostrado na Figura 1 é constituído por um tanque de fermentação (1) em que microorganismos ou células em cultura são cultivados, e um tanque de separação por membrana (2) dotado com uma membrana de separação (3) usada para a filtração do líquido de cultura. O tanque de separação por membrana (2) é instalado fora de um tanque de reação de fermentação e conectado ao tanque de fermentação (1)

através de uma linha de transferência de líquido (17) e uma linha de transferência de líquido (15) (linha de circulação).

O tanque de fermentação (1) tem uma função para continuamente cultivar microorganismos ou células em cultura e qualquer tanque pode ser usado como tal, desde que a linha de circulação possa ser conectada ao tanque; assim um fermentador de jarro ou semelhante que tem sido convencionalmente usado para a cultura de microorganismos ou células em cultura pode ser utilizado.

O tanque de fermentação (1) que é conectado a uma bomba de fornecimento de meio (6), é dotado com um agitador (7) de modo que um meio seja carregado para dentro do tanque de fermentação (1) por meio da bomba de fornecimento de meio e, se for necessário permite que o agitador (7) agite o líquido de cultura no interior do tanque de fermentação (1). Além disso, um dispositivo de fornecimento de gás (8) é também conectado a este, de modo que, se for necessário, um gás necessário é fornecido pelo dispositivo de fornecimento de gás (8). Nesta estrutura, com a finalidade de recuperar e reciclar o gás fornecido e para novamente fornecer o gás através do dispositivo de fornecimento de gás (8), uma tubulação é, de preferência, localizada, por exemplo, entre um espaço no topo do tanque de fermentação (1) e o dispositivo de fornecimento de gás (8) de modo que, permitindo-se que o gás de fornecimento corra na ordem do espaço no topo do tanque, pela tubulação e o dispositivo de fornecimento de gás (8), podendo ser conduzido, de preferência, para a recuperação e a reciclagem.

Além disso, um dispositivo de controle de sensor de pH 9 e uma bomba de fornecimento de solução de ajuste de pH 10 são ligados ao tanque de fermentação (1), se for necessário, de modo a se ajustar o pH do líquido de cultura. Naturalmente para se controlar o pH do líquido de cultura por fornecimento tanto de substância ácida como de alcalina à cultura, são, de

preferência, usadas uma multiplicidade de bombas de fornecimento de solução de ajuste de pH. Além disso, se for necessário também se liga a ele um ajustador de temperatura (11) de modo a se ajustar a temperatura do líquido de cultura para produzir um produto químico com alta produtividade. Além disso, os ajustes do pH e da temperatura foram exemplificados como ajustes das condições físico-químicas do líquido de cultura por dispositivos de medição e controle; no entanto, se for necessário, os processos de controle podem ser conduzidos sobre oxigênio dissolvido e ORP, e a concentração de microorganismos no líquido de cultura pode ser ainda medido por um analisador, tal como um sensor químico em linha, de modo que, com base no indicador resultante, podem ser controladas as condições físico-químicas. Além disso, usando-se valores medidos no ambiente físico-químico do líquido de cultura obtido pelos dispositivos de medição e controle como indicadores, pode ser ajustado conforme a necessidade a quantidade de carga do meio e velocidade dela.

Uma membrana de separação (3) pode ser instalada no interior do tanque de separação por membrana (2), e do mesmo como no tanque de fermentação (1), o formato e semelhantes do tanque de separação por membrana (2) não são limitados desde que se possa conectar a ele uma linha de circulação. Podem ser usadas como a membrana de separação (3) independentemente dos materiais inorgânicos e orgânicos a serem usados, quaisquer membranas de separação que se queira, desde que somente possam ser filtradas do líquido de cultura os microorganismos ou células em cultura; no entanto, é usada, de preferência, uma membrana porosa que tenha funções de separação e permeação adequadas de acordo com as propriedades do líquido a ser processado e aplicações que serão descritas abaixo, sendo a membrana provida, de preferência, com resistência a esterilização (a 120°C durante 30 minutos, por exemplo). Além disso, a membrana de separação (3) é conectada a uma bomba

(4), de modo a gerar uma diferença de pressão transmembrana entre o lado do líquido bruto e o lado da permeação da membrana de separação.

O tanque de separação por membrana (2) e o tanque de fermentação (1) são projetados, de preferência, para ter tais volumes que se ajuste a relação em volume do líquido de cultura do líquido de cultura no tanque de fermentação para o líquido de cultura no tanque de separação por membrana para 4 ou mais a 100 ou menos. Isto é, levando-se em consideração que geralmente o líquido de cultura que tem aproximadamente 80% do volume de cada um do tanque de separação por membrana (2) e do tanque de fermentação 2 está armazenado nele, os tanques são, de preferência, projetados de modo a ter ajustada a relação do volume do tanque de fermentação para o volume do tanque de separação por membrana para uma faixa de 4 ou mais a 100 ou menos. Com esta estrutura, é possível se tornar o aparelho compacto, e também se prolongar o tempo de retenção do líquido de cultura no tanque de fermentação de modo que se possam obter condições de cultura adequadas, os custos com energia serem reduzidos, seja melhorada a velocidade de produção de um produto químico e se possa facilitar o manejo operacional do aparelho.

Uma linha de desvio (26), que é conectada ao tanque de separação por membrana do lado da saída do líquido de cultura por desvio do tanque de separação por membrana do lado de influxo do líquido de cultura do tanque de separação por membrana (2), é instalada nas linhas de circulação (linha de transferência de líquido (17) e linha de transferência de líquido (15)) de modo que, sem se fornecer uma porção do líquido de cultura transferido do tanque de fermentação (1) ao tanque de separação por membrana (2), a porção do líquido de cultura pode ser juntada ao líquido de cultura não filtrado da linha de transferência de líquido (15), desviando-se do tanque de separação por membrana (2). Além disso, na presente modalidade, uma extremidade da

linha de desvio (26) está conectada à linha de transferência de líquido (15); no entanto, uma outra estrutura em que a linha de desvio (26) está conectada ao tanque de fermentação (1) por desvio do tanque de separação por membrana (2) do lado de influxo do líquido de cultura do tanque de separação por membrana (2), ou está conectada a uma porção entre o tanque de fermentação (1) e o lado de influxo de líquido de cultura do tanque de separação por membrana (2). Isto é, uma extremidade (lado a montante) da linha de desvio (26) pode ser conectada à linha de transferência de líquido (17), sendo a outra extremidade (do lado a montante) sendo conectada ao tanque de fermentação (1), de modo a fazer refluir diretamente a uma porção do líquido de cultura que foi desviada do tanque de separação por membrana (2) para o tanque de fermentação (1). Alternativamente, as duas extremidades da linha de desvio (26) podem ser conectadas à linha de transferência de líquido (17) de modo a permitir que uma porção do líquido de cultura que foi desviada do tanque de separação por membrana (2) seja diretamente juntada ao líquido de cultura na linha de transferência de líquido (17) para ser fornecida do tanque de fermentação (1).

Meios de controle da quantidade de fluxo (25) são instalados na linha de desvio do tanque de separação por membrana (2). A quantidade de fluxo do líquido de cultura a ser fornecida ao tanque de separação por membrana (2) pode ser controlada por estes meios de controle da quantidade de fluxo. Os meios de controle da quantidade de fluxo podem ser projetados ou em forma de uma válvula ou de bomba, e do ponto de vista de custos, é preferível se usar uma válvula. NO caso em que é selecionada uma válvula como os meios de controle da quantidade de fluxo, a quantidade do líquido de cultura a ser fornecida ao tanque de separação por membrana (2) pode ser reduzida abrindo-se a válvula. Por outro lado, fechando-se a válvula, é permitido que todo o líquido de cultura que corre através da linha de

transferência de líquido (17) corra para dentro do tanque de separação por membrana (2). embora a estrutura da válvula não tenha limitações especiais, é preferível se usar uma válvula de diafragma ou uma válvula borboleta, pois depois da esterilização a vapor d'água, dificilmente resta qualquer líquido de cultura ou semelhante, devido à sua estrutura.

Além disso, no caso em que se emprega uma bomba como meios de controle da quantidade de fluxo (25), um processo de transferência de líquido pode ser conduzido de modo a permitir que o líquido de cultura corra na mesma direção que o líquido de cultura que corre através do tanque de separação por membrana (2), de modo que, aumentando-se a quantidade de líquido transferido da bomba, pode ser reduzida a quantidade do líquido de cultura a ser fornecido ao tanque de separação por membrana (2), ao passo que, por outro lado, interrompendo-se a transferência do líquido da bomba, permite-se que todo o líquido de cultura corra através da linha de transferência de líquido (17) e para dentro do tanque de separação por membrana (2).

A quantidade de fluxo do líquido de cultura a ser fornecido ao tanque de separação por membrana (2) é basicamente controlado dependendo de uma pressão no lado de influxo do líquido de cultura do tanque de separação por membrana. Por esta motivo, é instalado um medidor de pressão (29) no aparelho conforme mostrado na Figura 1. A pressão do lado de influxo de líquido de cultura do tanque de separação por membrana é medida pelo medidor de pressão (29), e no caso em que o valor medido for superior ao valor desejado, ativando-se os meios de controle da quantidade de fluxo (25) faz-se com que uma porção do líquido de cultura transferido do tanque de fermentação (1) se desvie do tanque de separação por membrana (2) e seja reciclado.

Além disso, é instalada na linha de circulação uma bomba (5) que controla a quantidade de fluxo do líquido de cultura a ser transferido do tanque

de fermentação. A bomba pode ser instalada na linha de transferência de líquido (17) ou na linha de transferência de líquido (15) (trajeto de retorno ao tanque de fermentação) e pode também ser instalada nas duas linhas. Embora o sistema, formato e o material para uma porção em contato com o líquido não sejam especialmente limitados, são de preferência usadas aquelas bombas que são resistentes à esterilização por vapor d'água na linha de circulação.

A Figura 6 mostra uma relação entre a velocidade linear do líquido de cultura na linha de circulação e uma quantidade de precipitação de cepas de levedura que têm uma capacidade de produzir ácido láctico, e com base nestes foi constatado que no caso em que a velocidade linear do líquido de cultura na linha de circulação (linha de transferência de líquido (17) e linha de transferência de líquido (15)) é de 2,5 cm/seg ou mais, pode-se fazer o líquido de cultura circular sem permitir que se precipitem bactérias no interior da tubulação. Portando, detectando-se a velocidade de fluxo linear do líquido de cultura no interior da linha de transferência de líquido (17) transferido do tanque de fermentação e/ou do líquido de cultura que não foi filtrado no interior da linha de transferência de líquido (15), operam-se os meios de controle da quantidade de fluxo (25) e a bomba (5) de um modo tal, de preferência, que a velocidade linear seja ajustada a 2,5 cm/seg ou mais. Além disso, pelo mesmo motivo, a velocidade linear do líquido de cultura na linha de desvio 236 é, de preferência, ajustada para 2,5 cm/seg ou mais.

Além disso, no caso em que, conforme já descrito, uma porção do líquido de cultura que tenha se desviado do tanque de separação por membrana se junta o líquido de cultura no tanque de fermentação ou ao líquido de cultura a ser transferido do tanque de fermentação para o tanque de separação por membrana, detectando-se a velocidade linear do líquido de cultura transferido do tanque de fermentação, pode-se operar os meios de controle da quantidade de fluxo (25) e a bomba (5) de modo a se ajustar a

velocidade linear para 2,5 cm/seg ou mais. Além disso, conforme será descrito mais abaixo, no caso em que se faz refluir o líquido de cultura que não foi filtrado da linha de transferência de líquido (15) para que se junte ao líquido de cultura no tanque de fermentação, enquanto se estiver refluindo de modo a ser acrescentada diretamente a uma porção do líquido de cultura da linha de transferência de líquido (17), a velocidade linear do líquido de cultura é, de preferência, ajustada para 2,5 cm/seg ou mais em cada uma das duas linhas. Isto é, na presente invenção, cada uma das velocidades lineares do líquido de cultura a ser transferido do tanque de fermentação para o tanque de separação por membrana, a velocidade linear do líquido de cultura não filtrado a se fazer refluir do tanque de separação por membrana para ser acrescentado ao líquido de cultura no lado a montante do tanque de separação por membrana e a velocidade linear do líquido de cultura que se faz desviar do tanque de separação por membrana é de preferência ajustado para 2,5 cm/seg ou mais.

Além disso, no aparelho mostrado na Figura 1, para se ajustar o fluxo na membrana de separação (3) e a quantidade do líquido de cultura no interior do tanque de fermentação, é instalado um sensor de nível (12) no tanque de fermentação (1). Detectando-se a quantidade do líquido de cultura no tanque de fermentação pelo sensor de nível (12), pode se controlar a bomba de fornecimento de meio (6). Para se ajustar o fluxo pode se controlar a quantidade do líquido de filtração. Embora o método para o controle da quantidade do líquido de filtração não seja especialmente limitado, pode ser instalado o dispositivo de controle da diferença de pressão do nível de líquido, por exemplo, que altera a quantidade de fluxo do líquido de filtração controlando-se na diferença de pressão do nível de líquido, ou então se pode alterar a quantidade de fluxo do líquido de filtração acionando-se uma bomba por emprego de energia de uma fonte de energia. Além disso, o aparelho de fermentação a ser usado para a produção de um produto químico da presente

invenção é, de preferência, dotado com uma linha de fornecimento de vapor d'água usada para a esterilização de um tanque de fermentação (1), um tanque de separação por membrana (2) e as linhas de transferência de líquido (15) e (17).

Dentre os diversos tipos de bombas a serem usadas na presente invenção, diversas bombas, tais com bomba centrífuga, uma bomba tubular e uma bomba de diafragma podem ser usados, e, de preferência, aquelas bombas em que a quantidade de líquido de circulação e a quantidade de líquido de filtração proveniente da membrana de separação possam ser calculadas com base em ajustes de vazão da bomba, sendo mais especificamente usadas uma bomba de diafragma e uma bomba tubular.

No método para produção de produto químico empregando-se o aparelho de fermentação que tem a estrutura citada acima, a cultura é conduzido, por exemplo, do seguinte modo. Em outras palavras, microorganismos ou células em cultura são continuamente cultivadas no tanque de fermentação (1), e o líquido de cultura é fornecido ao tanque de separação por membrana (2) do tanque de fermentação (1) através da linha de transferência de líquido (17) pela bomba (5) no interior da linha de circulação, e produzindo-se a diferença de pressão entre o lado do líquido bruto e o lado do líquido de filtração da membrana de separação (3) pela bomba (4) ou semelhante, o líquido de cultura é filtrado, de modo que pode ser coletado um líquido de filtração contendo ácido láctico ou semelhante (produto químico) que é um produto de fermentação pelos microorganismos ou células em cultura. Por outro lado, faz-se refluir um líquido de cultura que não foi filtrado para dentro do tanque de fermentação (1) através da linha de transferência de líquido (15). Neste momento a quantidade de fluxo da bomba (5) é ajustada para uma velocidade tal, (de 2,5 cm/seg ou mais, por exemplo, em velocidade de fluxo linear, conforme já descrito) que se impeça os microorganismos ou

células em cultura de se precipitar na linha de transferência de líquido (17) e na linha de transferência de líquido (15).

Neste caso, no entanto, quando a cultura e a separação por membrana são continuamente conduzidas, devido a um aumento na viscosidade do líquido de cultura e à contaminação da membrana de separação, assim como à contaminação do trajeto de fluxo devido à precipitação de microorganismos ou células em cultura no interior do tanque de separação por membrana, a pressão no interior do tanque de separação por membrana é aumentada. Quando a pressão no interior do tanque de separação por membrana é aumentada, aumentam-se os danos ao tanque de separação por membrana e a carga aplicada sobre os microorganismos ou células em cultura. Portanto, a pressão no interior do tanque de separação por membrana é de preferência ajustada para 1 MPa ou menos. Por outro lado, para se suprimir o aumento da pressão no interior do tanque de separação por membrana, quando é reduzida a quantidade de transferência e líquido do líquido de cultura do tanque de fermentação (1) pela bomba (5), as condições de cultura no interior do tanque de fermentação são muito alteradas fazendo com que os microorganismos ou células em cultura se precipitem no interior da linha de circulação resultando na redução da eficiência de produção.

Portanto, na presente invenção, faz-se uma porção do líquido de cultura a ser transferido do tanque de fermentação (1) ser desviada do tanque de separação por membrana (2) e faz-s a mesma refluir, em resposta a uma pressão do líquido de cultura do lado do influxo do tanque de separação por membrana (2). É mais preferível que a quantidade de fluxo do líquido de cultura que se faz desviar do tanque de separação por membrana (2) seja controlada de modo a se ajustar a pressão do líquido de cultura do lado do influxo do tanque de separação por membrana para 1 MPa ou menos. Neste caso, a pressão, mencionada neste caso, se refere a uma pressão manométrica, e na

presente invenção a pressão significa uma pressão manométrica, a não ser que seja especificado em contrário.

As flutuações de pressão no interior do tanque de separação por membrana podem ser medidas pelo medidor de pressão (29) instalado do lado do fornecimento do líquido de cultura, e com base nos resultados das medições a quantidade de fluxo do líquido de cultura que se faz desviar do tanque de separação por membrana é controlada de modo que possa ser controlado o aumento da pressão no interior do tanque de separação por membrana.

Por este motivo, impedindo-se que os microorganismos ou células em cultura no interior da linha de circulação se precipitem, é possível se conduzir a cultura de um modo estável. Além disso, como os danos ao tanque de separação por membrana e uma carga maior aplicada sobre os microorganismos ou células em cultura podem ser reduzidos, é possível se atingir altos rendimentos e alta produtividade.

Em outras palavras, em comparação com uma operação de fermentação convencional em bateladas, a velocidade de produção do produto de fermentação pode ser aumentada de modo que se obtém uma produção de fermentação muito eficiente, com uma recuperação eficiente do produto de fermentação. A velocidade de produção na cultura contínua pode ser calculada pela seguinte equação (1):

EQUAÇÃO 1

$$\text{Taxa de produção do produto químico (g/L. hora)} = \frac{\text{Concentração do produto químico (g/L) no líquido de filtração} \times \text{Taxa de extração do líquido de filtração (L/hora)}}{\text{Quantidade de líquido operacional do aparelho (isto é, a quantidade total do líquido de cultura) (L)}}$$

Além disso, uma velocidade de produção de fermentação em uma cultura em bateladas é calculada dividindo-se uma quantidade de produto (g)

no momento em que toda a fonte de carbono do material foi consumida por um tempo (h) necessário para o consumo da fonte de carbono e a quantidade de líquido de cultura neste momento (L).

O aparelho mostrado na Figura 1 pode ser, de preferência, revisado, do seguinte modo, por exemplo. Isto é, conforme mostrado na Figura 2, por exemplo, os meios de controle da quantidade de fluxo (25) podem ser, de preferência, projetados para serem operados em resposta aos resultados de medições do medidor de pressão (29). Além disso, uma válvula (27) que abre/fecha o tanque de separação por membrana pode ser disposta, de preferência, na linha de transferência de líquido (17) do lado a jusante do ponto conectado à linha de desvio (26), em uma posição do lado a montante do tanque de separação por membrana (2), ou então uma válvula (28) que abre/fecha o tanque de separação por membrana pode ser disposta, de preferência, na linha de transferência de líquido (15) do lado a montante do ponto conectado à linha de desvio (26), em uma posição do lado a montante do tanque de separação por membrana (2). No caso em que são instaladas a válvula (27) que abre/fecha o tanque de separação por membrana e/ou a válvula (28) que abre/fecha o tanque de separação por membrana, pode-se fazer todo o líquido de cultura que atravessa a linha de transferência de líquido (17) fluir para a linha de desvio (26) por solicitação. Com esta disposição, mesmo quando ocorre uma falha no interior do tanque de separação por membrana devido à contaminação da membrana de separação e contaminação do trajeto do fluxo causado por microorganismos ou células em cultura que se precipitaram no interior do tanque de separação por membrana, o líquido de cultura a ser fornecido ao tanque de separação por membrana pode ser completamente interrompido de modo que possa ser conduzida a correção da falha no interior do tanque de separação por membrana e uma substituição.

Além disso, conforme mostrado na Figura 7, faz-se de preferência refluir o líquido de cultura que não foi filtrado da linha de transferência de líquido (15) para que se junte ao líquido de cultura no interior do tanque de fermentação, e faz-se também, de preferência, refluir de modo a ser acrescentada diretamente a uma porção do líquido de cultura da linha de transferência de líquido (17). Nesta ocasião, a bomba (5), que controla a velocidade de fluxo e a quantidade de fluxo do líquido de cultura que não foi filtrado que será refluído para que se junte ao líquido de cultura no interior do tanque de fermentação, e também controla a velocidade de fluxo e a quantidade de fluxo do líquido de cultura a ser transferido do tanque de fermentação, está disposta do lado a jusante mais próximo do tanque de fermentação de uma ponta de ramificação (14B) na linha de transferência de líquido (15); e de um modo separado disso, uma bomba (16) é também disposta do lado a jusante do ponto de junção (14A) na linha de transferência de líquido (17). Com esta estrutura, os circuitos de circulação, que são independentes do tanque de fermentação (1), são formados com o lado a jusante do ponto de junção (14A) na linha de transferência de líquido (17) e no tanque de separação por membrana (2), assim como com o lado a montante do ponto de ramificação (14B) na linha de transferência de líquido (15). E faz-se com que cada uma das bombas (16) e (5) controle a velocidade de fluxo e a quantidade de fluxo do circuito de circulação formado com o lado a jusante do ponto de junção (14A) na linha de transferência de líquido (17) e no tanque de separação por membrana (2), assim como com o lado a montante do ponto de ramificação na linha de transferência de líquido (15) e a velocidade de fluxo e a quantidade de fluxo do circuito de circulação formado com o lado a jusante do ponto de ramificação (14B) na linha de transferência de líquido (15) e no tanque de fermentação (1), assim como com o lado a montante do ponto de junção (14A) na linha de transferência de líquido (17), de um modo

independente entre si. Por este motivo, mesmo quando a velocidade de fluxo do líquido de cultura no interior do circuito de circulação é aumentada por ajuste da bomba (16), isto é, mesmo quando a velocidade linear (velocidade de fluxo linear) do líquido de cultura que corre na superfície da membrana de separação (3) no interior do tanque de separação por membrana é aumentada, a velocidade de fluxo do lado a jusante do ponto de ramificação (14B) na linha de transferência de líquido (15) pode ser mantida a um nível constante pela bomba (5) de modo que a velocidade do líquido de cultura voltando para o tanque de fermentação (1) é mantida a um nível constante. Isto é, como a velocidade de fluxo do líquido de cultura no interior do tanque de fermentação pode ser melhorada, mantendo-se constantes as condições de cultura no interior do tanque de fermentação, é possível se manter condições desejáveis para a cultura no tanque de fermentação, durante o período de tempo em que o líquido estiver sendo transferido a uma velocidade que impede a precipitação dos microorganismos ou células em cultura e consequentemente sendo também possível a condução de uma cultura estável, com a manutenção de alto rendimento e alta produtividade.

Além disso, quando a velocidade do líquido de cultura que não foi filtrado a ser devolvido ao tanque de fermentação (1) do líquido de cultura se elevar, há a tendência de fluir uma turbulência na corrente de líquido, com uma influência resultante do coeficiente de transferência de oxigênio kLa; portanto, mantendo-se constante a velocidade do líquido que é devolvido ao tanque de fermentação (1) do líquido de cultura, é possível se estabilizar a eficiência de fermentação.

Na presente invenção, para se aumentar a velocidade de fluxo na superfície da membrana de separação (3) no interior do tanque para consequentemente aumentar a velocidade de produção, mantendo-se adequadamente a eficiência da cultura, ao mesmo tempo em que se aumenta a quantidade de recuperação do líquido de filtração resultante, isto é, do produto de

fermentação, a quantidade de fluxo ou a velocidade de fluxo do líquido de cultura que não foi filtrado e que se pretende fazer refluir para ser acrescentado ao líquido de cultura no tanque de fermentação (isto é, a quantidade de fluxo ou a velocidade de fluxo do lado a jusante do ponto de ramificação (14B) na linha de transferência de líquido (15)) α é de preferência ajustada para ser inferior à quantidade de fluxo ou à velocidade de fluxo do líquido de cultura não filtrado e que se pretende fazer refluir para ser acrescentado ao líquido de cultura entre o tanque de fermentação e o tanque de separação por membrana (isto é, a quantidade de fluxo ou velocidade de fluxo do lado a jusante do ponto de ramificação (14A) na linha de transferência de líquido (17)) β, e a relação destes α/β é, de preferência, ajustada para ser 1 ou menos.

Além disso, conforme mostrado na figura 14, a linha de transferência de líquido (15) usada para se fazer refluir o líquido de cultura que não foi filtrado para ser acrescentado ao líquido de cultura no interior do tanque de fermentação é, de preferência, projetada para ter uma abertura em uma posição que esteja imersa no líquido de cultura armazenado no tanque de fermentação (1). Fazendo-se com que uma das extremidades da linha de transferência de líquido (15) se abre nesta posição, faz-se com que o coeficiente de transferência de oxigênio kLa no interior do tanque de fermentação (1) praticamente não flutue a partir do valor determinado desejado, de modo que a taxa de redução do coeficiente do valor ajustado pode ser eliminada dentro de 30% o valor determinado.

Conforme mostrado na Figura 8, uma multiplicidade de tanques de separação por membrana (2) são de preferência, conectados em paralelo ente si. Com esta disposição, mesmo que ocorra uma falha no interior de um dos tanques de separação por membrana, os tanques se separação por membrana podem ser trocados e usados adequadamente, de modo que possa se continuar com a cultura sem interromper a filtração no interior do tanque de separação por membrana. Além disso, no caso em

que os tanques de separação por membrana estão conectados em paralelo um com o outro, conectando-se uma linha de fonte de vapor d'água aos respectivos tanques de separação por membrana, pode se conduzir a esterilização em cada um dos tanques de separação por membrana individualmente.

Na presente invenção, para se aumentar o rendimento do produto de fermentação, é, de preferência, prevenida a contaminação da membrana de separação, e a cultura contínua é, de preferência, mantida de modo estável durante um longo período de tempo. Para tal fim, controla-se a porcentagem de recuperação que é uma taxa da quantidade de fluxo do líquido de filtração obtido da membrana de separação (3) em relação à quantidade de fluxo do líquido de cultura a ser transferido para a membrana de separação (a que se referirá doravante, às vezes, simplesmente como "porcentagem de recuperação"), de preferência, para ser de 10,0% ou menos.

A porcentagem de recuperação se refere a uma relação da quantidade do líquido de filtração proveniente da membrana de separação (3) para a quantidade de líquido de cultura (quantidade do líquido circulado) que foi transferida para o tanque de separação por membrana por unidade de tempo, e é calculada pela seguinte equação 2. No caso em que uma multiplicidade de tanques de separação por membrana estão conectados entre si, calcula-se a partir da quantidade de líquido de filtração e da quantidade do líquido circulado em cada um dos tanques de separação por membrana. Além disso, a quantidade de líquido de filtração pode ser substituída pela área de membrana de separação usada nos tanques de separação por membrana e pelo fluxo que pode ser controlado por acionamento de modo que a equação 2 possa ser convertida na equação 3 seguinte.

EQUAÇÃO 2

$$\text{Porcentagem de recuperação do líquido de filtração por líquido circulado (\%)} = \frac{\text{Quantidade de líquido de filtração (m3/dia) x 100}}{\text{Quantidade de líquido circulado para a membrana de separação (m3/dia)}}$$

EQUAÇÃO 3

$$\text{Porcentagem de recuperação da quantidade de líquido de filtração por líquido circulado (\%)} = \frac{\text{Área de membrana de separação (m2) X FLUXO (M/DIA) X 100}}{\text{Quantidade de líquido circulado ao tanque de separação por membrana (m3/dia)}}$$

Para se controlar a porcentagem de recuperação, podem ser ajustadas a quantidade de líquido de cultura a fluir para dentro do tanque de separação por membrana e/ou a quantidade de líquido de filtração proveniente da membrana de separação. Isto é, são, de preferência controlados um ou mais fatores selecionados da quantidade de líquido circulado, fluxo e quantidade do líquido de filtração. Para se controlar a quantidade de líquido circulado, são, de preferência, ajustadas as vazões das bombas (5) e (16) localizadas do lado a montante do tanque de separação por membrana, conforme já descrito. Como o método para o controle do fluxo ou da quantidade de líquido de filtração, é, de preferência conduzido o ajuste da vazão da bomba (4).

Portanto, no aparelho mostrado na Figura 1, por exemplo, medidores de fluxo são instalados na linha de transferência de líquido (17) e na linha de extração do líquido de filtração da membrana de separação (3), e monitorando-se regularmente quantidade do líquido circulado e a quantidade do líquido de filtração, é calculada a porcentagem de

recuperação (equação 2), de modo que as bombas (4) e (5) sejam acionadas, de preferência, enquanto as suas vazões estiverem sendo controladas, de modo a se ajustar a porcentagem de recuperação para 10,0% ou menos.

Como o método de se controlar o fluxo ou a quantidade de liquido de filtração, além dos ajustes da vazão da bomba (4), podem ser propostos ajustes da diferença de pressão de nível de líquido, sucção por um líquido, gás etc, ou de uma pressurização para o tanque de separação por membrana. Utilizando-se qualquer um destes métodos, por exemplo, pode ser conduzida uma operação de acionamento para se controlar somente o fluxo, sendo a quantidade de líquido circulado mantida em um nível constante. Além disso, pode também ser conduzida uma operação de acionamento para controlar a quantidade de líquido circulado, sendo o fluxo mantido em um nível constante.

A porcentagem de recuperação é, de preferência, controlada para ser ajustada para 5,0% ou menos. Do ponto de vista de se aumentar a eficiência energética, a porcentagem de recuperação é ajustada para ser a mais alta possível. Portanto, o limite inferior da porcentagem de recuperação é, de preferência, ajustado para ser de pelo menos,01% ou mais.

Em seguida discutiremos o fluxo. O fluxo pode ser calculado a partir da seguinte equação 4.

EQUAÇÃO 4

$$\text{Fluxo} = \frac{\text{Quantidade de líquido de filtração } (m^3/\text{dia})}{\text{Área de membrana de separação } (m^2)}$$

É evidente que a área de membrana usada no aparelho pode ser ajustada conforme desejado. O volume (m^3/dia) da quantidade de líquido de filtração é, de preferência, obtido medindo-se o volume da quantidade de líquido de filtração em um dia; no entanto, o volume de líquido de filtração por dia pode ser esquematicamente calculado medindo-se o volume da quantidade

de líquido de filtração durante aproximadamente uma hora. Na presente invenção, o fluxo é, de preferência, ajustado para 0,500 m/dia ou menos, sendo mais preferível para uma faixa de 0,050 m/dia ou mais a 0,400 m/dia ou menos. No caso em que o fluxo exceder 0,500 m/dia, torna-se às vezes difícil a manutenção da cultura contínua pelo controle da porcentagem de recuperação. Além disso, no caso em que o fluxo for inferior a 0,050 m/dia, este fato significa que a área da membrana de separação é demasiado grande, tornando difícil a sua utilização industrial do ponto de vista econômico.

Em seguida a descrição abaixo tratará de um exemplo de produção pra um produto químico a ser conduzida utilizando-se o aparelho mostrado na Figura 1.

Em primeiro lugar um material contendo microorganismos e cultura (meio) é armazenado no tanque de fermentação (1), e acrescentando-se um neutralizador a ele conforme a necessidade, mantém-se o interior do tanque de fermentação (1) dentro de limites de pH de 4 a 8, sendo a sua temperatura mantida dentro de limites de 20 a 50°C. Com este arranjo, é conduzida a cultura dos microrganismos, e durante a cultura são produzidos produtos de fermentação desejados (produtos químicos) tais como álcool, um ácido orgânico, um aminoácido, um ácido nucleico, e semelhantes. Durante este processo, para que a cultura é conduzida continuamente para a obtenção de um produto de fermentação desejado, o meio contendo nutrientes a serem usados para a cultura é fornecido ao tanque de fermentação (1) continua ou intermitentemente através de uma bomba de fornecimento de meio (6).

Além disso, concomitantemente com a cultura faz-se o líquido de cultura no interior do tanque de fermentação (1) ser continuamente circular entre o tanque de fermentação (1) e o tanque de separação por membrana (2) de modo a se ajustar a velocidade de fluxo linear no interior da linha de circulação para 2,5 cm/seg ou mais pela bomba (5). No tanque de separação

por membrana (2), o líquido de cultura é filtrado e separado, usando-se uma membrana de separação, em um líquido de cultura não filtrado contendo os microrganismos e em um líquido de filtração contendo produtos de fermentação. Resulta disso que o líquido de filtração contendo produtos de fermentação pode ser extraído do sistema do aparelho, e por subsequente concentração, destilação e cristalização do líquido de filtração, pode ser obtido um produto de fermentação tendo uma maior pureza. Por outro lado o líquido de cultura que não foi filtrado contendo microorganismos ou células em cultura, que foi filtrado e separado é mantido no interior do tanque de fermentação (1) de modo que a concentração dos microrganismos no tanque de fermentação possa ser mantida em um alto nível, e possa ser conduzida a cultura com uma alta produtividade de um produto químico.

Neste caso, a velocidade de fluxo linear no interior da linha de circulação pode ser calculada a partir (quantidade de fluxo por unidade de tempo)/(área de seção transversal da tubulação). Alternativamente, um sensor de velocidade de fluxo digital Coriolis ou um medidor de fluxo eletromagnético do tipo de duas linhas de eletrodos sem contato, ou semelhantes pode ser conectado à tubulação para se conduzir as medições. Detectando-se a saída de tal medidor de fluxo digital, pode ser controlada a bomba (5), os meios de controle da quantidade de fluxo (25) e semelhantes.

A concentração dos microorganismos ou células em cultura no líquido de cultura no tanque de fermentação (1) é, de preferência, mantida em um alto nível, mas não deve produzir um estado inadequado para o crescimento dos microorganismos ou células em cultura, que possa resultar em uma taxa mais alta de morte destas; assim é possível se obter uma produtividade com um grau mais elevado de eficiência. Mantendo, por exemplo, a concentração a 5 g/L ou mais em peso seco, é possível se obter a eficiência de produção desejada.

Para se manter esta concentração adequada, se for necessário, os microorganismos ou células em cultura são de preferência extraídos do tanque de fermentação. Quando a concentração dos microorganismos ou células em cultura no interior do tanque de fermentação se torna demasiado alta, há uma tendência de se produzir a contaminação na membrana de separação. Extraindo-se os microorganismos ou células em cultura e mantendo-se a concentração em um nível apropriado, pode ser evitada a contaminação da membrana de separação. Além disso, como o desempenho de produtividade de um produto químico tende a ser alterado pela concentração dos microorganismos ou células em cultura no tanque de fermentação, o desempenho de produtividade pode ser mantido dentro de limites fixos, extraindo-se os microorganismos ou células em cultura, servindo o desempenho de produtividade como um indicador.

O fornecimento da matéria prima para cultura e a extração do líquido de cultura (transferências de líquido do líquido de cultura para o tanque de separação por membrana) podem ser conduzidos a partir de um ponto adequado no tempo. Isto os tempos de partida do fornecimento da matéria prima para cultura e a extração do líquido de cultura não precisam ser necessariamente coincidentes. Além disso, o fornecimento da matéria prima para cultura e a extração do líquido de cultura pode ser conduzida contínua ou intermitentemente.

Além disso, se for necessário, a quantidade de líquido de cultura no interior do tanque de fermentação pode ser, de preferência, ajustada usando-se um sensor de nível (12). Os ajustes da quantidade do líquido de cultura no interior do tanque de fermentação podem também ser conduzidos não se medindo o nível do líquido de cultura no tanque de fermentação, mas medindo-se o peso do líquido de cultura.

Na presente invenção, o número de aparelhos de fermentação não é especialmente limitado desde que possa ser gerado um produto químico, durante a cultura dos microorganismos ou células em cultura. Em geral a operação de cultura contínua é, de preferência, conduzida em um único tanque de fermentação, considerando-se o manejo da cultura; no entanto devido a outras considerações, tais como pequenas dimensões da capacidade do tanque de fermentação, pode ser usada uma multiplicidade de tanques de fermentação. Neste caso, mesmo quando é conduzida uma cultura contínua, com uma multiplicidade de tanques de fermentação conectados em paralelo entre si, ou em série, usando-se tubulações, pode ser obtido um produto resultante com alta produtividade.

Na presente invenção, o líquido de cultura se refere a um líquido obtido como resultado do crescimento de microorganismos ou células em cultura na matéria prima para cultura, e a matéria prima para cultura se refere a um nutriente ou semelhante que pode acelerar o crescimento de microorganismos ou células em cultura a serem cultivados e que permite que seja produzido de preferência um produto químico ou semelhantes que é um produto alvo. A composição da matéria prima para cultura pode ser alterada conforme desejado a partir da composição da matéria prima para cultura no tempo de cultura inicial para tornar maior a produtividade do produto químico alvo.

Como microorganismos ou células em cultura a serem usados na presente invenção, podemos citar como exemplos levedura tal como fermento biológico para pão, frequentemente usado industrialmente, bactérias, tais como *Escherichia coli* e bactérias corineformes, fungos filamentosos, *Actinomycetes*, células animais e células de insetos. Mais especificamente são preferencialmente usados organismos eucarióticos, tais como levedura, sendo, dentre estes, preferivelmente usada a levedura. Os microorganismos ou células

em cultura a serem usados podem ser separados e isolados do ambiente natural ou podem ser aqueles cuja natureza tenha sido parcialmente modificada por mutação ou por recombinação genética. Dentre estes microorganismos ou células em cultura, são selecionados e usados, de preferência, aqueles que têm uma grande capacidade de produção para o produto químico alvo. Na presente invenção, refere-se à cultura de microorganismos como sendo "fermentação" ou "cultura de fermentação".

Como matéria prima para cultura, pode ser usada qualquer material desde que acelere o crescimento dos microorganismos ou células em cultura a serem cultivados e possa produzir, de preferência, um produto químico alvo. Exemplos específicos de matéria prima para cultura incluem: uma fonte de carbono, uma fonte de nitrogênio, sal inorgânico e um meio fluido geral que contenha nutrientes de traços orgânicos tais como aminoácidos e vitaminas conforme necessário.

Como fontes de carbono, podem ser usados sacarídeos, tais como glicose, sacarose, frutose, galactose e lactose, líquidos açucarados de amido contendo estes sacarídeos, melaço de batata doce, melaço de açúcar de beterraba e melaço de alto teste; além disso, podem ser usados ácidos orgânicos, tais como ácido acético, alcoóis, tais como etanol e glicerina.

Como fonte de nitrogênio pode ser usado, como auxiliar, gás amônia, água de amônia, sais de amônio, ureia, sais nitratos e outras fontes orgânicas de nitrogênio, tais como bolos de óleo, líquido de hidrólise de soja, solventes de caseína, outros aminoácidos, vitaminas, licor concentrado de milho, levedura ou extratos de levedura, extratos de carne, peptídeos, tais como peptona e diversas bactérias cultivadas e seus hidrolisados.

Podem ser adequadamente acrescentados como sais inorgânicos fosfato, sal de magnésio, sal de cálcio, sal de ferro, sal de manganês e assim por diante. Quando os microorganismos necessitam de nutrientes específicos

para o seu crescimento pode ser acrescentado alimento nutritivo correspondente em forma de um preparado autêntico ou um produto natural que o contém. Além disso, pode ser também usado conforme a necessidade um agente antiespumante.

Na presente invenção, a concentração de sacarídeos no líquido de cultura é mantida, de preferência, em 5 g/L ou menos. O motivo por que é desejável se manter a concentração de sacarídeos a 5 g/L ou menos é para reduzir ao mínimo a quantidade de sacarídeos que são eliminados devido à extração do líquido de cultura.

Em geral, a cultura de microorganismos ou células em cultura é conduzida a um pH na faixa de 4 a 8 a uma temperatura de 20 a 50°C. O pH do líquido de cultura pode ser ajustado a um valor predeterminado dentro dos limites citados acima usando-se materiais tais como um ácido inorgânico ou um ácido orgânico, um material alcalino, ureia, carbonato de cálcio e um gás amônia. Além disso, se for necessário se elevar a velocidade de fornecimento de oxigênio, podem ser usados meios tais como manutenção de uma concentração de oxigênio a 21% ou mais por acréscimo de oxigênio ao ar, pressurização do interior do tanque de reação de fermentação, aumento da velocidade de agitação, aumento da quantidade extraída.

Na presente invenção, depois de uma concentração de microorganismos ou células em cultura ter sido aumentada conduzindo-se uma cultura em bateladas ou uma cultura com alimentação em bateladas no estágio inicial da cultura, pode ser iniciada a cultura contínua; ou então podem ser semeadas bactérias com uma alta concentração, podendo a cultura contínua ser conduzida depois de se ter iniciado a cultura.

No tocante aos produtos químicos (produtos de fermentação) a serem produzidos pela presente invenção, não especialmente imitados desde que sejam substâncias que são produzidas pelos microorganismos ou células

em cultura no líquido de cultura, eles podem ser selecionados conforme se queira, dependendo dos microorganismos ou células em cultura a serem cultivados. Exemplos específicos incluem substâncias, tais como álcool, ácido orgânico, aminoácido, ácido nucleico e semelhantes que são produzidos em massa nas indústrias de fermentação Exemplos de alcoóis incluem: etanol, 1,3-propanodiol, 1,4-butanodiol e glicerol, exemplos de ácidos orgânicos incluem: ácido acético, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido succínico, ácido málico, ácido itacônico e ácido cítrico e exemplos dos ácidos nucleicos incluem: nucleosídeos, tais como inosina e guanosina, nucleotídeos tais como ácido inosínico e ácido guanílico e compostos de diamina tais como cadaverina. Além disso, a presente invenção pode ser aplicada à produção de substâncias tais como enzimas, antibióticos e proteína de recombinação.

A descrição abaixo discutirá os microorganismos ou células em cultura usados para a obtenção de um produto químico desejado, sendo exemplificados os produtos químicos específicos.

No tocante aos microorganismos ou células em cultura que podem ser usados na produção de ácido láctico pela presente invenção, embora não especialmente limitados podem ser usadas bactérias de ácido láctico, de preferência. As bactérias do ácido láctico mencionadas no presente documento são definidas como microorganismos procarióticos que produzem ácido láctico de rendimento 50% ou mais em rendimento relacionado com açúcar para a glicose consumida. Exemplos de bactérias de ácido láctico desejáveis incluem qualquer uma do gênero de *Lactobacillus*, Pediococcus, Tetrgenococcus, Carnobacterium, Vagococcus, Leuconostoc, Oenococcus, Atopobium, Streptococcus, Enterococcus, Lactococcus e Bacillus. Dentre estes, selecionando-se as bactérias de ácido láctico que tem um alto rendimento relacionado com açúcar de ácido láctico conforme a necessidade, pode ser conduzida de modo desejável a produção de ácido láctico.

Além disso, as bactérias do ácido láctico que podem ser selecionadas são aquelas que têm um rendimento alto associado com açúcar de ácido L-láctico como ácidos lácticos. O ácido L-láctico é uma espécie de isômeros óticos do ácido láctico e é claramente distinto do ácido D-láctico que forma um enantiômero seu. Exemplos de bactérias do ácido láctico que têm um alto rendimento de ácido L-láctico associado com açúcar incluem: *Lactobacillus yamanashiensis*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus agilis*, *Lactobacillus aviaries*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbruekii*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus sharpeae*, *Pediococcus dextrinicus*, *Lactobacillus lactis*, e assim por diante, e pode ser feita uma seleção dentre eles de modo a ser usada para a produção de ácido L-láctico.

No tocante aos microorganismos ou células em cultura a serem aplicáveis à produção de ácido d-láctico, podem ser usados, por exemplo, *Lactobacillus delbruekii*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Sporolactobacillus laevolacticus*, *Sporolactobacillus inulinus*, e assim por diante.

No caso em que o ácido L-láctico ou o ácido D-láctico é produzido usando-se a presente invenção, podem ser usados microorganismos ou células em cultura aos quais é artificialmente acrescentada uma capacidade de produção de ácido láctico ou aqueles nos quais se aumenta tal atividade. Como um método de se acrescentar a capacidade de produção de ácido láctico ou para aumentar a capacidade de produção de ácido láctico pode ser usado um método conhecido com o uso de mutação por droga; no entanto é preferível se empregar um microorganismo recombinante. Como microorganismos, são de preferência usados aqueles microorganismos recombinantes em que a capacidade de produção de ácido L-láctico ou de ácido D-láctico é acrescentada aos microorganismos ou células em cultura, ou é aumentada

neles, introduzindo-se um gene de desidrogenase de ácido L-láctico (a que se refere doravante às vezes como L-LDH) ou um gene de desidrogenase do ácido D-láctico (a que se refere às vezes no presente documento como D-DLH).

Como hospedeiro do microorganismo recombinante mencionado acima podem ser usadas, de preferência, células de *Escherichia coli* que são células procarióticas, bactérias do ácido láctico e levedura que constituem eucariontes, sendo especialmente preferível se usar levedura. Dentre as leveduras são usadas, de preferência aquelas que pertencem a um gênero de Saccharomyces, sendo mais preferível *Saccharomyces cerevisiae*.

Como L-LDH ou D-LDH, sem especial limitação, pode ser desejável se empregar aquelas que consistem em uma desidrogenase de ácido L-láctico ou uma desidrogenase de ácido D-láctico, que é uma proteína que tem uma ativação tal como a conversão de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) do tipo não oxidada e de um ácido pirúvico em nicotinamida adenina dinucleotídeo do não oxidada (NAD +) e ácido L-láctico ou ácido D-láctico, codificados ali. Dentre estes, como a L-LDH, uma L-LDH derivada de *Homo sapiens* ou uma L-LDH derivada de origem de rã podem ser usadas se for desejável. Dentre as derivadas de rã,, é desejável se usar uma L-LDH derivada da rã que pertence ao sapo do Suriname (Pipidae), dentre elas, uma L-LDH derivadas de *Xenopus laevis* é ainda mais desejável. Além disso, como a D-LDH é usado, de modo desejável, um gene derivado de *Lactobacillus plantarum* ou de *Pediococcus acidilactici* ou de *Bacillus laevolacticus*, sendo ainda mais preferível um gene derivado de *Bacillus laevolacticus*.

O gene de um tipo de polimorfismo genético e o gene de um tipo de mutagênese causado por indução de mutação são incluídos no L-LDH ou no D-LDH a serem usados na presente invenção. O gene do tipo de polimorfismo genético se refere àqueles em que uma porção da sequência base de um gene

é alterada devido a uma mutação natural no gene. Além disso, a indução de mutação se refere a um processo em que uma mutação é artificialmente induzida a um gene. A indução de mutação é conduzida usando-se um método em que é usado um kit (Mutan-K, fabricado por TAKARA BIO Inc.) para introdução de mutação direcionada a sítio, ou um método em que é usado um kit (BD Diversify PCR Random Mutagenesis, fabricado por (CLONTECH Inc.)) para a introdução de mutação aleatória. Além disso, pode ser usado como L-LDH ou como D-LDH a ser usada na presente invenção, mesmo uma que tenha uma deficiência ou uma inserção em uma porção da sequência de bases, desde que ela codifique a proteína que tem uma atividade de L-lactato desidrogenase ou uma atividade de D-lactato desidrogenase.

Depois da produção de um ácido L-láctico, a separação e a purificação do ácido L-láctico contido em um líquido de filtração obtido da membrana de separação (3) podem ser conduzidos combinando-se uma concentração, destilação cristalização convencionalmente conhecidas, e assim por diante. São propostos, por exemplo, um método em que depois do pH do líquido de filtração da membrana de separação (3) ter sido ajustado par 1 ou menos, o líquido resultante é extraído usando-se éter dietílico acetato de etila e assim por diante; ou um método em que, depois de ter sido adsorvido em uma resina de troca de íons e de ter sido lavado, conduz-se uma eluição sobre ele; um método em que, depois de se ter feito reagir com álcool na presença de um catalisador ácido, o éster resultante é destilado e um método em que o líquido de cultura é cristalizado e precipitado em forma de um sal de cálcio ou de um sal de lítio. É preferível se propor um método em que um líquido concentrado de ácido L-láctico obtido por evaporação da umidade do líquido de filtração da membrana de separação (3) é submetido à destilação. Neste caso, no tocante à destilação, conduz-se a destilação enquanto se fornece água, de modo a manter constante a concentração de umidade de um líquido de fonte

de destilação. Depois da destilação da solução aquosa do ácido L-láctico o líquido resultante é concentrado por aquecimento e evaporação da sua umidade, de modo que pode ser obtido um ácido L-láctico purificado tendo uma concentração alvo. NO caso em que é obtida em forma de um destilado uma solução aquosa de ácido L-láctico tendo um componente de baixo ponto de ebulição, tal como etanol e ácido acético, é preferível se remover o componente de baixo ponto de ebulição por processo de concentração o ácido L-láctico. Depois da operação de destilação, o destilado é submetido à remoção de uma impureza usando-se uma resina de troca de íons, carbono ativado, uma separação cromatográfica, ou semelhante, de modo que se possa obter um ácido L-láctico com um grau mais elevado de pureza.

Depois de se ter produzido do mesmo modo um ácido D-láctico, a separação e a purificação do ácido D-láctico contido em um líquido de filtração obtido da membrana de separação (3) pode ser conduzidas combinando-se operações convencionalmente conhecidas tais como concentração, destilação, cristalização e assim por diante. São propostos, por exemplo, um método em que depois do h do líquido de filtração da membrana de separação (3) ter sido ajustado para 1 ou menos, o líquido resultante é extraído usando-se éter dietílico, acetato de etila e assim por diante; ou um método em que, depois de se ter adsorvido em uma resina de troca de íons e de se ter lavado conduz-se sobre o líquido uma eluição; um método em que depois de se ter feito reagir com álcool na presença de um catalisador ácido, o éster resultante é destilado; e um método em que o líquido de cultura é cristalizado e precipitado em forma de sal de cálcio ou de sal de lítio. É preferível se propor um método em que um líquido de ácido D-láctico concentrado obtido por evaporação da umidade do líquido de filtração da membrana de separação (3) é submetido a destilação. Neste caso, a destilação é, de preferência, conduzida enquanto se está fornecendo

água para manter a concentração de umidade do líquido de fonte de destilação constante. Depois da eluição da solução aquosa de ácido D-láctico, o líquido resultante é concentrado por aquecimento e evaporação da sua umidade, de modo que pode ser obtido um ácido D-láctico purificado tendo uma concentração alvo. No caso em que a soluções aquosa de ácido D-láctico tendo um componente de baixo ponto de ebulição (tal como etanol e ácido acético) é obtido em forma de um destilado, é preferível que o componente de baixo ponto de ebulição seja removido pelo processo de concentração do ácido D-láctico. Depois da operação de destilação, o destilado é submetido à remoção de uma impureza usando-se uma resina de troca de íons, carbono ativado, uma separação cromatográfica ou semelhante, de modo que pode ser obtido um ácido D-láctico com um grau de pureza mais elevado.

No tocante aos microorganismos ou células em cultura que devem ser usados na produção de etanol pela presente invenção, embora não haja nenhuma limitação específica, podem ser usadas, de preferência, leveduras que pertencem a qualquer um dos gêneros de *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* e *SchizoSaccharomyces*. Dentre estes podem ser adequadamente usadas *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* e *SchizoSaccharomyces pombe*. Além disso, pode também ser desejável se empregar as bactérias que pertencem ao gênero *Lactobacillus* ou ao gênero *Zymomonas*. Dentre estes pode ser desejável se usar *Lactobacillus brevis* ou *Zymomonas mobilis*.

Os microorganismos ou células em cultura que podem ser usados para a produção de etanol podem ser microorganismos ou células em cultura nos quais se melhora artificialmente a capacidade de produzir etanol. Mais especificamente podem ser usados aqueles que têm uma porção da natureza parcialmente modificada por mutação ou recombinação genética. Um exemplo

desses que têm uma porção da sua natureza modificada é dado como levedura em que um gene de glicoamilase de um mofo que pertence ao gênero *Rhizopus* é combinado de modo a adquirir a capacidade de utilização do amido bruto (The Microorganism, 3: 555-564 (1987)).

Como métodos de separação e purificação de etanol contido em um líquido de filtração obtido da membrana de separação (3), por exemplo, pode ser desejável utilizar um método de purificação que utiliza um método destilação, e um método de concentração e purificação usando uma membrana NF ou uma membrana RO ou uma membrana de separação fabricada de zeólito.

Pode ser desejável se empregar como microorganismos ou células em cultura a serem usados na produção de ácido pirúvico pela presente invenção, embora não haja nenhuma limitação específica, bactérias, por exemplo, que pertencem a qualquer um dos gêneros de *Pseudomonas, Corynebacterium, Escherichia a Acinetobacter*. É mais desejável se empregar também bactérias de *Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli* e assim por diante.

Podem ser usados como microorganismos ou células em cultura que podem ser usadas para a produção de ácido pirúvico, microorganismos ou células em cultura às quais é artificialmente melhorada a capacidade de produção de ácido pirúvico, ou aquelas cuja natureza é parcialmente modificada por mutação ou por recombinação genética. Pode ser desejável se empregar, por exemplo, aquelas bactérias cujo gene de ATPase diretamente se refere à produção de ATP por foSforilação oxidante sofreu mutação ou foi removido. Além disso, pode ser desejável se usar mofos, leveduras e semelhantes. Podem ser usados, por exemplo, aqueles mofos ou leveduras que pertencem a um dos gêneros de *Saccharomyces, Toluropusis, Candida* e *Schizophyllum*. É mais preferível que o ácido pirúvico possa ser produzido

usando-se mofos ou leveduras de *Sacchromyces cerevisie, Sacharomyces copsis, Candida glabrata, Candida lipolytica, Toluropusis glabrata, Schizophyllum commune* assim por diante.

A separação e a purificação para um ácido pirúvico contido no líquido de filtração obtido da membrana de separação (3) podem ser conduzidas usando-se um método em que se usa uma coluna de troca de ânions. Pode ser desejável de empregar um método de purificação que emprega, por exemplo, um trocador de íons de sal fraco, representado pelo documento JP-A No.l 6- 345683.

Pode ser desejável se empregar como microorganismos ou células em cultura a serem usados na produção de um ácido succínico pela presente invenção, embora não haja nenhuma limitação específica, bactérias que pertencem a um gênero de *Anaerobiospirillum* e a um gênero *Actinobacillus*, por exemplo. Mais especificamente são propostos *Anaerobiospirillum succiniproducens*, descrito no relatório da patente U.S. No. 5.143.833, e *Actinobacillus succinogenes*, divulgado por James B. Mckinlay *et al.* (Applied Microbiol. Biotechnol., 71: 6651-6656 (2005)). Além disso, podem ser utilizadas bactérias corineformes pertencendo ao gênero *Corynebacterium, Brevibacterium* e *Escherichia coli* e assim por diante. É desejável se empregar como bactérias corineformes *Corynebacterium glutamicum, Brevibacterium flavum, Brevibacterium lactofermentum* e assim por diante.

Podem ser usados como microorganismos ou células em cultura que podem ser usados para a produção do ácido succínico, microorganismos ou células em cultura em que uma capacidade de produção de etanol é artificialmente melhorada. Mais especificamente, pode ser usado, por exemplo, um microrganismo que tem uma capacidade de produção de ácido succínico melhorada por recombinação genética, e usando este microorganismo pode

ser aumentada a produtividade de ácido succínico, Pode ser usado como um tal microorganismo *Brevibacterium flavum* MJ233AB-41 (número confidencial: FERM BP-1498) que tem uma deficiência em lactato desidrogenase, divulgado em JP-A No. 2005-27533, *Corynebacterium glutamicum*, descrito no Documento não Patentário 1 citado acima e cepa AFP111 de *Escherichia coli* que é uma cepa deficiente em piruvato formato-liase e lactado desidrogenase, descrita no relatório da patente U.S. No. 5.770.435.

A separação e a purificação para um ácido succínico contido no líquido de filtração obtido da membrana de separação (3) podem ser conduzidas por um método de purificação normal para um ácido succínico. É desejável se empregar, por exemplo, um método de purificação em que se combinam um processo de eletrodiálise de decomposição de água e concentração e cristalização a vácuo, sendo tal método descrito em JP-A No. 2005-333886.

É desejável se usar como microorganismos ou células em cultura que podem ser usados para a produção do ácido itacônico, não sendo especificamente limitados, mais exatamente mofos ou leveduras. É mais preferível se propor um processo de produção para um ácido itacônico usando-se mofos que pertencem ao gênero *Aspergillus* ou *Ustilago*, ou leveduras que pertencem ao gênero de *Candida* ou *Rhodotorula.* Dentre estes, pode ser desejável se empregar mofos tais como *Aspergillus terreus, Aspergillus itaconicus, Ustilago maydis, Ustilago cynodontis, e Ustilago rabenhorstina* ou *Candia antarctica* para a produção de um ácido itacônico.

A separação e a purificação para um ácido itacônico contido no líquido de filtração obtido da membrana de separação (3) são conduzidas, de preferência, usando-se ultrafiltração e eletrodiálise. Pode ser proposta, por exemplo, a ultrafiltração que é descrita em JP-B No. 50958, ou um método de

purificação por eletrodiálise em que é usada uma membrana de resina de troca de cátions do tipo sal.

Podem ser usados como microorganismos ou células em cultura a serem usadas para a produção de 1,3-propanodiol pela presente invenção, embora não especificamente limitados, cepas nativas, incluindo microrganismos específicos como os que pertencem ao gênero *Klebsiella, Clostridium* ou *Lactobacillus* que tem uma atividade de sintetizar 1,3-propanodiol a partir do glicerol.

Para produzir 1,3-propanodiol a partir de glicerol, o microorganismo inclui, de preferência (a) pelo menos um gene que codifica polipeptídeo que tem uma atividade de glicerol hidratase; (b) pelo menos um gene que codifica um fator de reativação de glicerol hidratase; e (c) pelo menos um gene que codifica uma atividade catalisadora não específica para converter aldeído 3-hidróxi-propiônico em 1,3-propanodiol.

É mais preferível se empregar o microorganismo recombinante capaz de produzir 1,3-propanodiol a partir de glicose. Como hospedeiro do microorganismo recombinante, são de preferência empregados os microorganismos recombinantes selecionados do grupo que consiste em: gênero *Klebsiella*, gênero *Clostridium*, gênero *Lactobacillus*, gênero *Cytrobacter*, gênero *Enterobacter*, gênero *Aerobacter*, gênero *Aspergillus*, gênero *Saccharomyces*, gênero *SchizoSaccharomyces*, gênero *ZygoSaccharomyces*, gênero *Pichia*, gênero *Kluyveromyces*, gênero *Candida*, gênero *Hansenula*, gênero *Debaryomyces*, gênero *Mucor*, gênero *Torulopsis*, gênero *Methylobacter*, gênero *Salmonella*, gênero *Bacillus*, gênero *Aerobacter*, gênero *Streptomyces*, gênero *Eschericia* e gênero *Pseudomonas*, sendo mais preferível se empregar *Escherichia coli*.

O microorganismo recombinante capaz de produzir 1,3-propanodiol a partir de glicose é preparado, de preferência, como um

microorganismo recombinante contendo: (a) pelo menos um gene que codifica polipeptídeo que tem uma atividade de 3-fosfato de glicerila desidrogenase; e (b) pelo menos um gene que codifica polipeptídeo que tem uma atividade de glicerol-3-fosfatase. Mais especificamente, o microorganismo recombinante inclui, de preferência, um gene em que o fato de reativação de glicerol desidratase é codificado por orfX e orfZ isolados de regulon dha. Além disso, o microorganismo recombinante é, de preferência, preparado como um microorganismo recombinante que é deficiente em atividade de glicerol quinase e/ou em uma atividade de glicerol desidrogenase e/ou em uma atividade de triosefosfato isomerase.

A separação e a purificação de 1,3-propanodiol contido no líquido de filtração obtido da membrana de separação (3) podem ser conduzidas por concentração e cristalização.

Utilizam-se, de preferência, como os microorganismos ou células em cultura a serem usados para a produção de cadaverina pela presente invenção, embora sem nenhuma limitação específica, como um exemplo específico, aqueles microorganismos em que as atividades enzimáticas da lisina descarboxilase e/ou antiportador de lisina-cadaverina, possuídas pelo microorganismo são acentuadas. É mais desejável que se proponha o microorganismo recombinante no qual é inserido um gene que codifica lisina descarboxilase e/ou antiportador de lisina-cadaverina. O mais desejável é propor microorganismo recombinante no qual são inseridos um ou dois ou mais tipos de genes que codificam lisina descarboxilase.

Quando se produz cadaverina usando-se um microorganismo recombinante, é empregado de preferência um microorganismo recombinante que tem como hospedeiro *Escherichia coli* ou bactérias corineformes. E mais preferível que se usem as bactérias corineformes que tenham uma atividade de lisina descarboxilase e também tenham pelo menos um de tolerância a

auxotrofina homosserina e a S-(2-aminoetil)-L-cisteína. Dentre as bactérias corineformes são usadas com mais preferência as selecionadas do gênero *Corynebacterium* ou do gênero *Brevibacterium* e *Corynebacterium glutamicum.* Além disso,o microrganismo tem, de preferência, uma deficiência da atividade de homosserina desidrogenase e a deficiência da atividade de homosserina desidrogenase é, de preferência, causada por uma geração de mutação devida a uma inserção de gene.

A separação e a purificação de cadaverina contida no líquido de filtração obtido da membrana de separação (3) podem ser conduzidas combinando-se métodos conhecidos tais como concentração, destilação e cristalização. Pode ser usado, de preferência, um método de purificação usando cristalização, por exemplo, conforme mostrado em JP-A No. 2004-222 569. Na presente invenção são preparados diversos materiais poliméricos dependendo dos ácidos a serem usados durante a fermentação contínua e no caso em que a aplicação de um material polimérico do qual se exige uma grande pureza emprega-se de preferência o método de purificação que utiliza a cristalização. Quando o pH do líquido de cultura é mantido usando-se ácido clorídrico, pode ser recuperado dicloridrato de cadaverina por cristalização do líquido de filtração. Mais especificação é proposto um método em que, por fermentação contínua, o pH do líquido de cultura é mantido por ácido dicarboxílico de modo que é recuperado dicarboxilato de cadaverina. Neste momento o ácido carboxílico é, de preferência, preparado em forma de um ácido dicarboxílico alifático e/ou aromático que tenha somente dois grupos carboxila como grupos funcionais e é ainda mais preferível se empregar qualquer um dos ácidos, selecionados do grupo que consiste em: ácido adípico, ácido sebácico, ácido 1,12-dodecano dicarboxílico, ácido succínico, ácido isoftálico e ácido tereftálico.

Podem ser usados como os microorganismos ou células em cultura a serem usados para a produção de ácido nucleico pela presente invenção, sem nenhuma limitação especial, aqueles que têm uma capacidade de alta produção de ácido nucleico, que podem ser isolados do campo natural, ou podem ser usados microorganismos procarióticos cuja capacidade de produção tenha sido artificialmente aumentada. Mais especificamente podem ser usados aqueles cuja natureza foi parcialmente modificada por mutação e recombinação genética.

A descrição a seguir tratará da modificação de uma porção da natureza. Para se produzir eficientemente um ácido nucleico, é necessário se sintetizar um ácido nucleico a ser armazenado e também excretar o ácido nucleico resultante da célula. Por este motivo, modificando-se a natureza de microorganismos ou células em cultura, isto é, aumentando-se a quantidade de uma enzima relacionada com um trajeto biossintético do ácido nucleico, reduzindo-se uma atividade enzimática relacionada com um trajeto de degradação do ácido nucleico, ou modificando-se a proteína relacionada com a excreção do ácido nucleico para fora da célula ou a composição da membrana celular, podem ser preparados microorganismos ou células em cultura que podem efetivamente produzir um ácido nucleico.

Mais especificamente, para a produção de inosina, é desejável se projetar os microorganismos ou células em cultura para não ter nenhuma atividade de adenilsuccinato sintetase ou somente uma atividade fraca. Além disso, eles são também projetados para não ter nenhuma atividade de ácido inosínico desidrogenase, ou somente uma fraca atividade. Além disso, eles também são projetados para não ter nenhuma atividade de nucleosidase ou somente uma atividade fraca. Ao se produzir guanosina, é desejável que os microorganismos ou células em cultura sejam projetados para não ter nenhuma atividade de adenilsuccinato sintetase ou somente uma fraca atividade. Além

disso, eles são também projetados para não ter nenhuma atividade de guanilato redutase ou somente uma fraca atividade. Além disso, é desejável que eles também sejam projetados para não ter nenhuma atividade de nucleosidase ou somente uma atividade fraca. Além disso, é desejável que eles sejam projetados para não ter nenhuma atividade de nucleotidase ou somente uma atividade fraca. Ao se produzir uridina, é desejável que os microorganismos ou células em cultura sejam projetados para não ter nenhuma atividade de uridina fosforilase ou somente uma fraca atividade. Ao se produzir citidina, é desejável que eles sejam projetados para não ter nenhuma atividade de citidina desaminase ou somente uma fraca atividade, e também que não tenham nenhuma homosserina desidrogenase ou somente uma fraca atividade.

Podem ser de preferência usados como microorganismos ou células em cultura a serem usados para a produção de um ácido nucleico pela presente invenção, bactérias corineformes ou *Bacillus subtilis*. Ao se produzir inosina, por exemplo, são usadas como bactérias corineformes bactérias pertencentes ao gênero *Corynebacterium*. Dentre o gênero *Corynebacterium*, empregam-se, de preferência, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Corynebacterium guanofaciens* ou *Corynebacterium petrophilium*. Além disso, como Bacillus subtilis, são propostas bactérias pertencendo ao gênero Bacillus, e dentre estes são de preferência usados *Bacillus subtilis, Bacillus liqueniformis e Bacillus pumilus*. Além disso, quando se produz guanosina, são usadas como bactérias corineformes, bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* e dentre elas são usadas, de preferência, *Corynebacterium glutamicum*. Ao se produzir uridina ou citidina, são usados como *Bacillus subtilis*, bactérias pertencendo o gênero *Bacillus*, e dentre estas *Bacillus subtilis*.

A separação e a purificação de um ácido nucleico contido no líquido de filtração obtido da membrana de separação (3) podem ser

conduzidos combinando-se métodos conhecidos tais como o método de processamento de resina de troca de íons, um método de cristalização por resfriamento e concentração, um método de separação por membrana e semelhantes. Para se remover impurezas, a purificação pode ser conduzida usando-se o método conhecido de adsorção em carvão ativado e o método de recombinação.

Quando se produz aminoácido de acordo com a presente invenção, como o aminoácido correspondente, os exemplos preferidos seus incluem: L-treonina, L-lisina, ácido L-glutâmico, L-triptofano, L-isoleucina, L-glutamina, L-arginina, L-alanina, L-histidina, L-prolina, L-fenilalanina, ácido L-aspártico, L-tirosina, metionina, serina, valina e leucina.

Quando se produz L-treonina, por exemplo, podem ser usados como microorganismos ou células em cultura, bactérias que pertencem ao gênero *Escherichia*, gênero *Providencia*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium* ou *Serratia*. Dentre estes, especialmente os exemplos de bactérias preferíveis incluem: *Escherichia coli*, *Providencia rettgeri*, *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum* e *Serratia mrcescens*.

Podem ser usadas, de preferência, como microorganismos ou células em cultura a serem usadas para a produção de L-lisina ou de ácido L-glutâmico, *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*, ou *Brevibacterium lactofermentum*.

Podem ser usadas, de preferência, como microorganismos ou células em cultura a serem usadas para a produção de L-triptofano, *Corynebacterium gulutamicum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* e *Escherichia coli*.

Podem ser usadas, de preferência, como microorganismos ou células em cultura a serem usadas para a produção de L-isoleucina,

Corynebacterium gulutamicum, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum* ou *Serratia marcescens.*

Podem ser usadas, de preferência, como microorganismos ou células em cultura a serem usadas para a produção de L-glutamina, *Corynebacterium gulutamicum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum* ou *Flavobacterium rigense.*

Podem ser usadas, de preferência, como microorganismos ou células em cultura a serem usadas para a produção de L-arginina, *Corynebacterium gulutamicum*, *Brevibacterium flavum*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* ou *Bacillus subtilis.*

Podem ser usadas, de preferência, como microorganismos ou células em cultura a serem usadas para a produção de L-alanina, *Brevibacterium flavum* ou *Arthrobacter oxydans.*

Podem ser usadas, de preferência, como microorganismos ou células em cultura a serem usadas para a produção de L-histidina, *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium ammoniagenes*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* ou *Streptomyces coelicolor.*

Podem ser usados, de preferência, como microorganismos ou células em cultura a serem usados para a produção de L-prolina, *Corynebacterium glutamicum*, *Kurthia catenaforma*, *Serratia marcescens* ou *Escherichia coli.*

Podem ser usados, de preferência, como microorganismos ou células em cultura a serem usadas para a produção de L-fenilalanina ou L-tirosina, *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum* ou *Escherichia coli.*

Podem ser usados, de preferência, como microorganismos ou células em cultura a serem usadas para a produção de ácido L-aspártico,

Brevibacterium flavum, *Bacillus megatherium*, *Escherichia coli* ou *Pseudomonas fluorescens*.

Podem ser usados, de preferência, como microorganismos ou células em cultura a serem usadas para a produção de metionina, *Corynebacterium glutamicum*.

Podem ser usadas, de preferência, como microorganismos ou células em cultura a serem usadas para a produção de serina, *Corynebacterium gulutamicum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum* ou *Arthrobacter oxydans*.

Podem ser usadas, de preferência, como microorganismos ou células em cultura a serem usadas para a produção de valina, *Brevibacterium lactofermentum*, *Serratia marcescens* ou *Klebsiella pneumoniae*

Podem ser usados, de preferência, como microorganismos ou células em cultura a serem usadas para a produção de leucina, *Corynebacterium gulutamicum*, *Brevibacterium lactofermentum* ou *Serratia marcescens*

Como microorganismos ou células em cultura a serem usados para a produção dos aminoácidos descritos acima, aqueles que têm originalmente uma grande capacidade de produção do aminoácido podem ser isolados do campo natural ou podem ser usados microorganismos ou células em cultura preparados por um aumento artificial da capacidade de produção dos microorganismos ou células em cultura exemplificados acima. Além disso, podem ser usados aqueles cuja natureza tenha sido parcialmente modificada por mutação e recombinação genética.

Como exemplos de microorganismos ou células em cultura cuja natureza tenha sido parcialmente modificada, citemos *Providencia rettgeri*, cuja capacidade de produzir L-treonina é aumentada, descrita no documento JP-A No. 2-219582, e *Corynebacterium glutamicum* cuja capacidade de produzir L-

alanina é melhorada, descrita na publicação nacional do pedido de patente japonesa No. 3- 500486.

A descrição abaixo tratará de uma membrana porosa que é usada, de preferência, como a membrana de separação na presente invenção.

Como a membrana porosa, pode ser usada uma membrana porosa que usa um material inorgânico tal como cerâmica ou um material orgânico tal como uma resina, como um material, sendo preferível uma membrana de separação porosa que contém uma camada de resina porosa. Esta membrana porosa tem uma estrutura em que uma camada de resina porosa que serve como uma camada funcional de separação é formada na superfície de um material de base poroso. O material de base poroso é usado para sustentar a camada de resina porosa, para conferir uma resistência à membrana de separação. A camada de resina porosa pode permear ou não o material de base poroso; no entanto, do ponto de vista da resistência é preferível se adotar a membrana que tem a camada de resina porosa permeando o material de base poroso. O material para o material de base poroso é preparado como um material orgânico e/ou um material inorgânico e dentre estes é preferível se usar uma fibra orgânica. Os materiais de base porosos preferidos são compostos de tecido, têxtil não tecido ou semelhante formado com o uso de fibras orgânicas, tais como fibras de celulose fibras de triacetato de celulose, fibras de poliéster, fibras de polipropileno e fibras de polietileno. Dente estes, são de preferência usados têxteis não tecidos, que tem facilmente controlada a sua densidade e podem ser facilmente fabricados.

A camada de resina porosa funciona como uma camada funcional de separação conforme descrito acima, e usa-se, de preferência para esta camada uma membrana polimérica orgânica. Os exemplos do material para a membrana polimérica orgânica incluem: resina à base de polietileno, resina à base de polipropileno, resina à base de poli(cloreto de vinila), resina à base de

poli(fluoreto de vinilideno), resina à base de polissulfona, resina à base de poliéter sulfona, resina à base de poliacrilonitrila, resina à base de poliolefina, resina à base de celulose e resina à base de triacetato de celulose. A membrana polimérica orgânica pode ser formada por uma mistura composta principalmente por estas resinas. Neste caso, o principal componente se refere a um componente que está contido numa proporção de 50% em peso ou mais, de preferência 60% em peso ou mais. Dentre estes é, de preferência, usada como um material de membrana formando a camada de resina porosa, resina à base de poli(cloreto de vinila), resina à base de poli(fluoreto de vinilideno), resina à base de polissulfona, resina à base de poliéter sulfona, resina à base de poliacrilonitrila, ou resina à base de poliolefina, que é facilmente formada em uma película usando-se uma solução e superior em durabilidade física e resistência química, sendo mais preferível a resina à base de poli(fluoreto de vinilideno) ou resina à base de poliolefina, sendo a mais preferível a resina à base de poli(fluoreto de vinilideno) ou uma resina composta principalmente por este polímero.

Como a resina à base de poli(fluoreto de vinilideno), é, de preferência, usado um homopolímero de fluoreto de vinilideno, podendo também ser usado, de preferência, um copolímero de um monômero à base de vinila copolimerizável com fluoreto de vinilideno. Como monômero à base de vinila copolimerizável com fluoreto de vinilideno, os exemplos incluem: tetrafluoretileno, hexafluorpropileno e tricloreto de fluoreto de etileno. Além disso, como resina à base de poliolefina são propostos polietileno, polipropileno polietileno clorado e polipropileno clorado, sendo preferido o polietileno clorado.

A descrição abaixo tratará em linhas gerais do método para formação de uma membrana porosa por meio de um exemplo.

Em primeiro lugar, no tocante a membrana porosa, a descrição abaixo tratará em linhas gerais de um método para a formação a uma

membrana plana. A membrana plana é obtida por processos em que, depois de uma película de revestimento de uma solução de estoque formadora de película contendo uma resina e um solvente que forma uma camada de resina porosa ter sido formada na superfície de um material de base poroso, sendo o material de base poroso impregnado com a solução de estoque formadora de película, somente a superfície do lado da película de revestimento do material de base poroso é colocado em contato com um banho de solidificação contendo um não solvente de modo a solidificar a resina de um modo tal, que seja formada uma camada de resina porosa na superfície do material de base poroso. Neste momento, a espessura média do material de base poroso, que é selecionado dependendo da sua finalidade, é, de preferência, ajustada para uma faixa de 50 μm ou mais até 3000 μm ou menos, a espessura média do material de base poroso é, ainda mais preferivelmente ajustada para uma faixa de 20 μm ou mais a 5000 μm ou menos, sendo o mais preferível numa faixa de 50 μm ou mais a 2000 μm ou menos.

Em seguida a descrição abaixo tratará em linhas gerais de um método para a formação de uma membrana de fibra oca. A membrana de fibra oca é formada por processos em que uma solução de estoque formadora de película composta de uma resina e de um solvente que forma uma camada de resina porosa é descarregada de uma tubulação do lado de fora de uma peça de bocal do tipo de dupla tubulação, sendo um fluido para formação de uma porção oca descarregado de uma tubulação no interior da peça de bocal do tipo de dupla tubulação e este é resfriado e solidificado em um banho de resfriamento. Neste momento, o diâmetro interno da fibra oca é, de preferência, ajustado par uma faixa de 200 μm ou mais a 5000 μm ou menos, sendo a espessura da película da camada de resina porosa ajustada, de preferência, para uma faixa de 20 μm ou mais a 2000 μm ou menos. Além disso, um têxtil ou um tecido tricotado tendo um formato tubular formado por

uma fibra orgânica ou uma fibra inorgânica, pode estar contido no interior da fibra oca.

A superfície externa da membrana de fibra oca assim obtida pode ser recoberta (laminada) com outra camada de resina porosa. Tal laminação da camada de resina porosa pode ser conduzida de modo a modificar as características da membrana de fibra oca, tal como a característica hidrófila, característica hidrófoba, seu diâmetro de poro ou semelhante, transformando-as em características desejáveis.

A camada de resina porosa a ser revestida na superfície pode ser formada por processos em que uma solução de estoque, formada pela dissolução de uma resina em um solvente, é colocada em contato com um banho de solidificação contendo um não solvente para solidificar a resina. Como o material para a resina a ser laminada, é, de preferência, usado, por exemplo, o mesmo material que o da camada de resina poroso. Além disso, sem limitação especial, o método de laminação pode ser conduzido imergindo-se a membrana de fibra oca na solução de estoque ou pode ser conduzido por aplicação da solução de estoque sobre a superfície da membrana de fibra oca, e depois da laminação uma porção da solução de estoque pode ser raspada ou eliminada por ventilação usando-se uma lâmina de ar de modo que a quantidade de laminação possa ser ajustada.

A membrana porosa a ser usada na presente invenção é projetada, de preferência, para ter um diâmetro de poro médio numa faixa de 0,01 μm ou mais a 1 μm ou menos. Quando o diâmetro de poro médio da membrana porosa se encontra na faixa de 001 μm ou mais a 1 μm ou menos, dificilmente ocorre a contaminação devida aos microorganismos usados para a fermentação, de modo que a condução da filtração pode ser mantida continuamente durante um período prolongado. Além disso, quando o diâmetro de poro médio da membrana porosa se encontra na faixa de 0,01 μm ou mais a

1 µm ou menos, é possível se produzir uma taxa de expulsão elevada que pode impedir que os microorganismos ou células em cultura vazem, ou pode manter uma propriedade de permeação elevada de água durante um longo período.

No caso em que o diâmetro de poro está próximo do tamanho dos microorganismos ou células em cultura, como estes poderiam diretamente obstruir os poros, o diâmetro de poro médio da membrana porosa é, de preferência, ajustado para 1 µm ou menos. Além disso, o diâmetro de poro médio da membrana porosa é, de preferência, ajustado para ter um tamanho que não é demasiado grande em comparação com o tamanho dos microorganismos ou células em cultura para impedir a ocorrência de problemas, tais como o vazamento dos microorganismos ou células em cultura, isto é, uma redução da taxa de expulsão. Por este motivo, no caso em que dentre microorganismos ou células em cultura, são usadas levedura, bactérias ou semelhantes cujas células são pequenas, o diâmetro de poro médio é, de preferência, ajustado para ter 0,4 µm ou menos, sendo mais preferível 0,2 µm ou menos. Os microorganismos ou células em cultura podem ter a tendência de produzir uma substância diferente do produto químico alvo, proteínas, polissacarídeos, por exemplo, ou semelhantes, que são facilmente agregados, ou então fragmentos de células podem ter a tendência de serem gerados devido a mortes dos microorganismos ou células em cultura no líquido de cultura. Para se evitar a contaminação da membrana porosa devido a estas substâncias, é mais preferível se ajustar o diâmetro de poro médio para 0,1 µm ou menos.

Com base nos fatos descritos acima, o diâmetro de poro médio da membrana porosa da presente invenção é, de preferência, ajustado para 0,4 µm ou menos, sendo mais preferível 0,2 µm ou menos, sendo o mais preferível 0,1 µm ou menos.

Por outro lado, no caso em que o diâmetro de poro médio for demasiado pequeno, a propriedade de permeação com água é reduzida, causando uma falha no processo operacional eficiente mesmo quando a membrana não está contaminada de modo que o diâmetro de poro médio da membrana porosa da presente invenção é, de preferência, ajustado para 0,01 µm ou mais. É mis preferível que ele seja ajustado para 0,02 µm ou mais, sendo o mais preferível 0,04 µm ou mais.

Neste caso o diâmetro de poro médio pode ser obtido por processos de medição em que por observação em microscópio eletrônico de varredura com uma ampliação de 10.000 vezes, todos os diâmetros de poros observados dentro da faixa de 9,2 µm x 10,4 µm são medidos e a média é calculada. No caso em que os poros não formam um círculo perfeito, um círculo com a mesma área (círculo equivalente) que a área de cada poro é calculada por um aparelho de processamento de imagem ou semelhante, e o diâmetro do círculo equivalente é definido como sendo o diâmetro do poro.

A membrana de separação a ser usada na presente invenção se torna melhor à medida que o desvio padrão σ dos diâmetros de poros é reduzido, isto é, se torna melhor à medida que se estreita a distribuição dos tamanhos de diâmetros de poros. A distribuição dos tamanhos de diâmetros de poro é, de preferência, estreitada de modo tal que o desvio padrão seja, de preferência, ajustado para 0,1 µm ou menos. Quando o desvio padrão dos diâmetros de poros é reduzido, isto é, quando os tamanhos dos diâmetros de poros são uniformizados, é possível se obter um líquido de filtração com características uniformes e também para facilitar o gerenciamento operacional do aparelho.

O desvio padrão σ dos diâmetros de poro é calculado pela seguinte equação 5, em que, supondo-se que o número de poros a ser observado dentro da faixa de 9,2 µm x 10,4 µm seja N, supondo-se que os diâmetros respectivos assim

medidos sejam X_k e supondo-se que o valor médio dos diâmetros de poro sejam X(ave).

EQUAÇÃO 5

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^{N} \left(X_k - X(ave)\right)^2}{N}}$$

Na membrana de separação a ser usada na presente invenção, a permeabilidade do líquido de cultura contendo um produto químico constitui um dos fatores críticos, e o coeficiente de permeabilidade a água pura da membrana de separação antes do seu uso, pode ser usado como um indicador de permeabilidade. Na presente invenção, o coeficiente de permeabilidade a água pura da membrana de separação é, de preferência, ajustado para 1×10^{-10} $m^3/m^2 \cdot s \cdot Pa$ ou mais, quando calculado usando-se água purificada tendo uma temperatura de 25°C derivada de uma membrana de osmose reversa, sendo a quantidade de água permeada medida a uma altura de espaço superior de 1 m. Além disso, para se obter uma quantidade suficiente de líquido de filtração em uso prático, o coeficiente de permeabilidade a água pura da membrana de separação é ajustado, de preferência, a uma faixa de 2×10^{-9} $m^3/m^2 \cdot s \cdot Pa$ ou mais a 6×10^{-7} $m^3/m^2 \cdot s \cdot Pa$ ou menos, sendo mais preferível de 2×10^{-9} $m^3/m^2 \cdot s \cdot Pa$ ou mais a 2×10^{-7} $m^3/m^2 \cdot s \cdot Pa$ ou menos.

A aspereza da superfície da membrana da membrana de separação a ser usada na presente invenção constitui um fato que influencia a contaminação da membrana de separação. Para se reduzir o coeficiente de descamação e a resistência da membrana da membrana de separação para que seja produzido um produto químico em condições de uma diferença de pressão inferior na transmembrana, justa-se, de preferência, a aspereza superficial de membrana da membrana de separação a 0,1 μm ou menos. Para

se produzir de modo estável um produto químico por supressão da contaminação torna-se a aspereza superficial, de prf, a menor possível.

Além disso, a aspereza superficial da membrana constitui um dos fatores que permitem que microorganismos ou células em cultura se fixem à superfície da membrana de separação para serem facilmente destacadas dela, por um efeito de lavagem da superfície da membrana derivado de um fluxo de líquido por uma agitação ou uma bomba de circulação. Destes pontos de vista também, reduz-se ao mínimo a aspereza superficial da membrana da membrana de separação, e ajusta-se, ainda mais preferivelmente, a 0,1 μm ou menos. No caso em que a aspereza superficial é de 0,1 μm ou menos, os microorganismos ou células em cultura que aderirem à membrana podem ser facilmente destacados.

Além disso, ajustando-se a aspereza superficial de membrana da membrana porosa para 0,1 μm ou menos, é possível se reduzir a força de cisalhamento exercida sobre a superfície da membrana durante a filtração dos microorganismos ou células em cultura, resultando disso que podem ser eliminados danos aos microorganismos ou células em cultura. Consequentemente, pode ser eliminada a contaminação da membrana de separação, podendo assim ser conduzido o processo de filtração estável durante um período prolongado.

Neste caso, a aspereza superficial de membrana se refere a um valor médio de flutuações na superfície da membrana em uma direção perpendicular à direção da superfície de membrana e conforme descrito abaixo, isso pode ser medido usando-se um microscópio de força atômica (AFM).

Dispositivo: Microscópio de força atômica (Nanoscope III, fabricado por Digital Instruments Co., Ltd.)

Condições: Sonda SiN Cantilever (fabricado por Digital Instruments Co., Ltd.)

: modo de varredura modo de Contato (medindo-se ao ar)

Modo de coleta em água (medindo-se em água)

: Faixa de varredura 10 μm, 25 μm em área retangular (medindo-se ao ar)

5 μm, 10 μm em área retangular (medindo-se em água)

: Resolução de varredura 512 x 512

Preparação de amostra: Durante a medição, uma amostra de membrana foi imersa em etanol à temperatura normal durante 15 minutos, e depois de ter sido imersa em água RO durante 24 horas para ser lavado, a amostra resultante foi secada ao ar e usado. Água RO se refere a água que tenha sido filtrada usando-se membrana de osmose reversa (membrana RO) que é um tipo da membrana de filtração, de modo que impurezas tais como íons e sais sejam excluídos dela. O tamanho de poros da membrana RO é de aproximadamente 2 nm ou menos.

A aspereza superficial de membrana d_{rough} é calculada pela seguinte equação 6, com base na altura da direção do eixo Z de cada um dos pontos medidos por AFM.

EQUAÇÃO 6

$$d_{rough} = \sum_{n=1}^{N} \frac{|Z_n - \overline{Z}|}{N}$$

Drough: Aspereza superficial (μm)

Z : Altura na direção do eixo Z (μm)

$\overline{Z}$: Altura média na faixa de varredura 9μm)

N : Número de amostras medidas

A membrana de separação mencionada acima pode ter qualquer formato desejado de acordo com o formato do tanque de separação por

membrana, e pode ser usada. NO caso de uma membrana de separação, por exemplo, em um modo de membrana plana, combinando-se ela com um elemento de suporte preparado separadamente, pode ser preparado um elemento de membrana de separação, conforme mostrado na Figura 3. Além disso, no tocante à membrana de fibra oca, ligando-se e vedando-se a porção oca usando-se um elemento produzido de uma resina ou semelhante, pode ser preparado um elemento de membrana de separação, conforme mostrado na Figura 4. Na presente invenção, considerando-se que a instalação da área de membrana por volume é vantajosamente conduzida, é preferível se usar a membrana de fibra oca.

Com referência aos desenhos, a descrição abaixo tratará em linhas gerais do elemento de membrana de separação.

A Figura 3 é uma vista em perspectiva esquemática que explica uma modalidade de um elemento de membrana de separação em que é usada uma membrana de separação da modalidade de membrana plana. Conforme mostrado na figura 3, o elemento de membrana de separação tem uma estrutura em que nas duas superfícies de uma placa de suporte (18) que apresenta rigidez, são dispostos um elemento de passagem de fluxo (19) e uma membrana de separação (20), nesta ordem. A placa de suporte (18) é dotada com uma seção côncava (21) em cada uma das duas superfícies. A membrana de separação (20) filtra um líquido de cultura. O elemento de passagem de fluxo (19) é usado para permitir que um líquido de filtração corra através da membrana de separação (20) eficientemente e para a placa de suporte (18). Faz-se o líquido de filtração contendo um produto químico e correndo para a placa de suporte (18) passar através da seção côncava (21) da placa de suporte (18) e extrai-se do aparelho de fermentação contínua através de uma tubulação coletora de líquido (22) que serve como meios de descarga. Neste caso, pode ser usado um método que utiliza uma diferença de pressão

no nível da água, uma bomba e uma filtração de sucção usando-se um líquido, um gás ou semelhante, ou um método para a pressurização no interior do sistema do aparelho ou semelhante como uma força de acionamento para uso na extração do líquido de filtração.

Além disso, no caso em que a área de membrana precisa ser ampliada para se ajustar ao tanque de fermentação, estes elementos de membrana de separação podem ser laminados de modo que a área de membrana possa ser ampliada.

A Figura 4 é uma vista em perspectiva esquemática apresentando um elemento de membrana de separação usando uma membrana de separação da modalidade de fibra oca, que é principalmente constituído por uma placa de suporte (18), membranas de separação (20) da modalidade de fibra oca, uma camada de vedação de resina superior (23) e uma camada de vedação de resina inferior (24). As membranas de separação (20), que são formadas em um feixe, são ligadas e presas à placa de suporte (18) pela camada de vedação de resina superior (23) e pela camada de vedação de resina inferior (24). A porção oca de cada membrana de separação (20) da modalidade de fibra oca é vedada pela camada de vedação de resina inferior (24) ligada e presa a ele de modo que fica impedido o vazamento do líquido de cultura. Por outro lado a porção oca de cada membrana de separação (20) da modalidade de fibra oca não é vedada pela camada de vedação de resina superior (23), sendo permitido à porção oca se comunicar com a tubulação de coleta de líquido (22). Este elemento de membrana de separação pode ser instalado no aparelho de fermentação contínua usando-se a placa de suporte (18). É permitido a um líquido de filtração que foi filtrado através da membrana de separação (20) atravessar a porção oca da membrana de fibra oca, e extrai-se o mesmo do aparelho de fermentação contínua através da tubulação de coleta de líquido (22). Como uma força de acionamento para uso na extração

do líquido de filtração, pode ser usado um método que utiliza uma diferença de pressão no nível da água, uma bomba e uma filtração por sucção usando-se um líquido, um gás ou semelhante, ou um método para a pressurização do interior do sistema de aparelho ou semelhante.

É desejável que o tanque de separação por membrana (2) dotado com as membranas de separação seja submetido a uma esterilização por vapor d'água a alta pressão e com este arranjo é possível se evitar que o tanque se contamine com diversas bactérias. A esterilização com vapor d'água a alta pressão da presente invenção se refere a um processo pelo qual os microorganismos ou células em cultura que estão presentes no tanque sejam esterilizados por calor e pressurização do tanque de separação por membrana usando-se vapor d'água. No tocante às condições de aquecimento e pressurização, é preferível se pressurizar e aquecer o tanque a 121,1°C, por exemplo, a uma pressão de vapor d'água de 1 atmosfera durante 20 minutos ou mais. Portanto o tanque de separação por membrana (12) do aparelho de fermentação contínua, as membranas de separação dispostas no tanque de separação por membrana (12) e os elementos que constituem o elemento são, de preferência, preparados com aqueles elementos que são resistentes a operações de esterilização a vapor d'água a alta pressão nestas condições. Assim, o interior do tanque de fermentação pode ser esterilizado incluindo o elemento de membrana de separação. Quando o interior do tanque de fermentação é mantido em uma condição esterilizável, é possível se evitar o risco de contaminação por microrganismos indesejáveis durante a fermentação contínua, e consequentemente se conduzir a fermentação contínua de um modo estável.

A membrana de separação e os elementos tais como a placa de suporte que constitui o elemento de membrana de separação são, de preferência, tornados resistentes às condições de 121,1°C, por exemplo, sob

uma pressão de vapor d'água de 1 atmosfera, durante 20 minutos ou mais, que são as condições para as operações de esterilização de vapor d'água, e enquanto estas condições forem satisfeitas, os tipos de membrana de separação e os elementos constituintes do elementos não são especialmente limitados. To tocante ao material para a membrana de separação que tem tal resistência, podem ser usados os materiais mencionados para a membrana porosa. Além disso, no tocante aos elementos constituintes do elemento para a placa de sustentação ou semelhantes, pode ser de preferência selecionado e usado metal, por exemplo, tal como aço inoxidável e alumínio, ou resinas, tais como resina à base de poliamida, resina à base de flúor, resina à base de policarbonato, resina à base de poliacetal, resina à base de poli(tereftalato de butileno), PVDF, resina à base de éter polifenilênico modificado, e resina à base de polissulfona.

EXEMPLOS

Referindo-se aos exemplos e aos exemplos comparativos, a descrição seguinte tratará da presente invenção em detalhes.

Mais especificamente, os exemplos 1 a 9 e os exemplos comparativos 1 a 4 explicam a produção contínua para um produto químico, que é conduzida usando-se um aparelho de fermentação contínua mostrado em qualquer uma das Figuras 2, 7, 9 e 13 a 16, em que o ácido L-láctico foi selecionado como produto químico, uma levedura (exemplo de referência 1) tendo uma capacidade de produzir ácido L-láctico foi usada como um microorganismo ou células em cultura, e uma membrana porosa (membrana plana: exemplo de referência 2) foi selecionada como uma membrana de separação.

Além disso, o exemplo 10 e o exemplo comparativo 5 explicam a produção contínua para um produto químico que é conduzida usando-se um aparelho de fermentação contínua mostrado na Figura 2, em que a cadaverina

(1,5-pentanodiamina) foi selecionada como o produto químico, um microorganismo tendo uma capacidade de produção de cadaverina foi usada como o microrganismo ou células em cultua e uma membrana porosa (membrana plana: exemplo de referência 2) foi selecionada como uma membrana de separação.

Além disso, o exemplo 11 e o exemplo comparativo 6 explicam a produção contínua para um produto químico, que é conduzida usando-se um aparelho de fermentação contínua mostrado na Figura 2, em que L-lisina foi selecionada como o produto químico, um microrganismo tendo uma capacidade de produzir L-lisina foi usado como o microrganismo ou células de cultura e uma membrana porosa (membrana plana: exemplo de referência 2) foi selecionada como uma membrana de separação.

Em cada um dos exemplos, uma válvula de borboleta foi usada como os meios de controle da quantidade de fluxo (25) de modo que fossem ajustadas a quantidade de fluxo e a pressão de fluxo de um líquido de cultura a fluir para dentro do tanque de separação por membrana.

No entanto, estes exemplos são usados algumas modalidades da presente invenção, e a presente invenção não se destina a ser limitada a estes exemplos.

(Exemplo de referência 1) Produção da Cepa de Levedura (Cepa SU014) tendo Capacidade de Produção de Ácido Láctico

No presente exemplo, uma levedura em que um gene L-ldh derivado de *Xenopus Laevis* tendo uma sequência de bases mostrada em SEQ ID NO: 1 foi introduzida a jusante de um promotor PDC1 foi usada como a levedura que tem a capacidade de produzir ácido láctico. A clonagem do gene L-ldh derivado de *Xenopus Laevis* foi conduzida usando-se um método de PCR. Em PCR, um DNA de fagemídeo preparado de acordo com um protocolo apenso de uma biblioteca de DNAc de rim de

Xenopus Laevis (disponível de STRATAGENE Corporation) foi usado como um molde.

Em uma reação de amplificação por PCR, polimerase KOD-Plus (disponível de Toyobo Co., Ltd) foi usada, e foram também usados tampão de reação, dNTPmix e semelhantes. Um DNA de fagemídeo ajustado de acordo com o protocolo apenso conforme descrito acima foi carregado no sistema de reação de 50 µL de modo a ser ajustado para 50 ng/amostra, um primer foi carregado de modo a ser ajustado a 50 pmol/amostra e polimerase KOD-Plus foi também carregado no sistema de modo a ser ajustado a 1 unidade/amostra. Depois da solução de reação ter sido desnaturada termicamente pelo amplificador de PCR iCycler (fabricado por Bio-Rad Laboratories, Inc.) a uma temperatura de 94°C durante 5 minutos, a solução resultante foi submetida a 30 ciclos de desnaturação térmica a 94°C durante 30 segundo, desnaturação do primer a 55°C durante 30 segundos e extensão dos filamentos complementar a 68°C durante 1 minuto, resfriando-se em seguida a uma temperatura de 4°C. Além disso, a reação foi conduzida de modo tal que a um primer de amplificação de gene (SEQ ID NOs: 2 e 3), foi acrescentada uma sequência de reconhecimento *SalI* e uma sequência de reconhecimento *NotI* do lado do terminal (5) e do lado do terminal (3), respectivamente.

Um fragmento amplificado por PCR foi purificado e depois dos seus terminais terem sido fosforilados por uma T4 polinucleotídeo Kinase (disponível de Takara Bio Inc.,) o fragmento resultante foi ligado com um vetor pUC118 (que foi clivado por uma enzima de restrição HincII, sendo a superfície de cisão submetida a um tratamento de desfosforilação). A ligação foi conduzida usando-se o kit DNA Ligation Kit Ver. 2 (disponível de Takara Bio Inc.). A solução de ligação foi transformada em células competentes DH5 α de *Escherichia coli* (fabricadas por Takara Bio Inc.) e estas foram espalhadas em uma placa LB contendo 50 µg/mL de substância antibiótica, ampicilina, e

cultivadas de um dia para o outro. NO tocante à colônia assim cultivada, um DNA de plasmídeo foi coletado por um kit de mini-preparação e clivado pelas enzimas de restrição SalI e NotI de modo que foi selecionado o plasmídeo em que foi inserido um gene ldh derivado de *Xenopus Laevis*. Uma série destas operações foi conduzida de acordo com o protocolo apenso.

O vetor pUC118 no qual o gene L-ldh derivado de *Xenopus Laevis* foi inserido foi clivado pelas enzimas de restrição SalI e NotI, de modo que o fragmento de DNA foi separado por eletroforese sobre gel de agarose a 1%, e o fragmento contendo o gene L-ldh de Xenopus Laevis foi purificado usando-se um método normal. O fragmento contendo o gene L-ldh foi ligado com a porção clivada XhoI/NotI de um vetor de expressão pTRS11, mostrado na Figura 5, e usando-se o mesmo método já descrito acima, um DNA de plasmídeo foi coletado e clivado por enzimas de restrição XhoI e NotI, de modo que foi selecionado o plasmídeo no qual o gene ldh proveniente de *Xenopus Laevis* foi inserido. Em seguida, o vetor de expressão como qual o gene L-ldh de Xenopus Laevis assim formado foi combinado é referido a um pTRS102.

Usando-se este pTRS102 como um molde de amplificação, um fragmento de PCR de 1,3 kb contendo o gene L-ldh de Xenopus Laevis e uma sequência terminadora TDH3 foi amplificado por PCR em que o oligonucleotídeo (SEQ ID NOs: 4 e 5) foi usado como um conjunto de primers. Neste caso, uma sequência mostrada em SEQ ID NO: 4 foi projetada de modo que pudesse ser acrescentada uma sequência correspondendo a 60 pares de bases a montante de um códon inicial do gene PDC1.

Em seguida, usando-se um plasmídeo pRS424 como um molde de amplificação, um fragmento de PCR de 1,2 kb contendo um gene TRP1 que serve como um marcador de seleção de levedura foi amplificado por PCR sendo um oligonucleotídeo (SEQ ID NOs: 6 e 7) usado como um conjunto de primers. Neste caso, uma sequência mostrada em SEQ ID NO: 7 foi projetada

para que pudesse ser acrescentada uma sequência que corresponde a 60 pares de bases a jusante de um códon de interrupção do gene PDC1.

Os fragmentos de DNA respectivos foram separados por eletroforese sobre gel de agarose a 1%, e purificados usando-se um método normal. Uma mistura do fragmento de 1,3 kb e o fragmento de 1,2 kb assim obtidos foi usada como um molde de amplificação, um fragmento de PCR de aproximadamente 2,5 kb, em que o gene L-ldh de Xenopus Laevis, a cujo terminal 5 e terminal 3 forma acrescentadas sequências respectivas correspondendo aos 60 pb a montante e a jusante do gene PDC1, e o terminador TDH3 e o gene TRP1 foram acoplados entre si, foram amplificados por um método de PCR em que foi usado o oligonucleotídeo (SEQ ID NOs: 4 e 7) como um conjunto de primers.

O fragmento de PCR foi separado por eletroforese sobre gel de agarose a 1%. Depois da purificação por um método normal, o fragmento resultante foi transformado em uma cepa NBRC10505 de *Saccharomyces cerevisiae* e cultivado sobre um meio de não aplicação de triptofano, de modo que fosse selecionada uma cepa transformada na qual foi introduzido o gene L-ldh de Xenopus Laevis a jusante de um promotor do gene PDC1 em um cromossomo.

Foi confirmado que a cepa transformada assim obtida era uma levedura em que o gene L-ldh de *Xenopus Laevis* foi introduzido a jusante do promotor de gene PDC1 no cromossomo do seguinte modo. Em primeiro lugar, um DNA de genoma da cepa transformada foi preparado usando-se um kit de extração de DNA de genoma "Gentorukun" (marca registrada) (fabricado por Takara Bio Inc.) e foi confirmado que, usando-se este DNA de genoma como um molde de amplificação, foi obtido por PCR, em que o oligonucleotideo (SEQ ID NOs: 8 e 9) foi usado como um conjunto de primers, um fragmento de DNA amplificado tendo aproximadamente 2,8 kg. Além disso, na cepa não

transformada, um fragmento de DNA amplificado de aproximadamente 2,1 kb foi obtido pelo PCR mencionado acima. Na descrição que segue, a cepa transformada na qual é introduzido o gene L-ldh de *Xenopus Laevis* à jusante do promotor de gene PDC1 em um cromossomo é denominada cepa B2. As sequências do lado a montante e do lado a jusante do gene PDC1 podem ser obtidas pela base de dados do genoma de Saccharomyces (URL:http:/www.yeastgenome.org/).

Em seguida a cepa SW015 de levedura em que o gene pdc1 é substituído por marcador TRP1, tendo o gene pdc5 uma mutação sensível a temperatura, descrito no panfleto da publicação internacional WO 2007/097260, foi ligado à cepa B2 obtida conforme foi descrito de modo a obter uma célula diplóide. A célula diplóide foi formada em um asco sobre um meio de formação de asco. O asco foi dissecado por um micromanipulador de modo que foram obtidas células monoplóides, e foi examinada a auxotrofia de cada célula monoplóide. Dentre as células monoplóides adquiridas, foram selecionadas as cepas que tinham o gene ldh de *Xenopus Laevis* inserido no lócus do gene pdc1, sendo o gene pdc5 submetido a uma mutação sensível a temperatura (incapaz de se desenvolver a 94°C). A cepa de levedura assim obtida foi definida como cepa SU014.

Além disso, no tocante a presença ou não da capacidade de produção de ácido láctico da cepa SU014, foram conduzidas medições por um método HPLC nas condições abaixo para confirmar se qualquer ácido láctico estava contido no fluido sobrenadante de um meio de cultura em que as células transformadas foram cultivadas em um meio SC (METHODS IN YEAST GENETICS 2000 EDITION, CSHL PRESS).

coluna Shim-Pack SPR-H (fabricada por Shimadzu Corporation)

Fase Móvel: ácido p-tolueno sulfônico a 5 mM (velocidade de fluxo: 0,8 mL/min).

Solução de Reação: ácido p-tolueno sulfônico a 5 mM, 20 mH bis/tris, EDTA • 2Na a 0,1 mM (velocidade de fluxo 0,8 mL/min).

Método de Detecção: Condutividade Elétrica

Temperatura : 45°C

Além disso, as medições de pureza ótica do ácido L-láctico foram conduzidas pelo método HPLC nas seguinte condições:

Coluna: Tsk-gel Enantio LI (fabricada por Tosoh Corporation)

Fase Móvel: solução aquosa e sulfato de cobre a 1 mM.

Velocidade de fluxo: 1,0 mL/min

Método de detecção: UV254 nm

Temperatura: 30°C

Além disso a pureza ótica do ácido L-láctico é calculada pela seguinte equação:

$$\text{Pureza ótica (\%)} = 100 \times (L - D)/(L + D)$$

Neste caso, L representa a concentração de ácido L-láctico e D representa a concentração do ácido D-láctico.

Como resultado da análise HPLC foi detectado um ácido L-láctico e a quantidade de um ácido D-láctico foi o limite de detecção ou menos. Com base nos exames acima, foi confirmado que a cepa SU014 tinha uma capacidade de produção de ácido L-láctico

(Exemplo de referência 2) Produção de Membrana Porosa Plana

Empregando-se uma resina de poli(fluoreto de vinilideno) (PVDF) como uma resina e N,N-dimetil acetamida (DMAc) como um solvente, eles foram suficientemente agitados a uma temperatura de 90°C, sendo obtida a seguinte solução de estoque:

PVDF: 13,0% em peso

DMAc: 87,0% em peso

Depois das soluções de estoque mencionadas acima terem sido resfriado até uma temperatura de 25°C, estas foram aplicadas a um têxtil não tecido (material de base poroso) fabricado de fibras de poliéster tendo uma densidade de 0,48/cm^3 e uma espessura de 220 μm que tinham sido preliminarmente afixadas a uma placa de vidro, sendo então imediatamente imersas em um banho de solidificação que tinha a composição abaixo a uma temperatura de 25°C durante 5 minutos de modo que foi obtida uma membrana porosa tendo uma camada de resina porosa formada sobre o material de base poroso:

- Água: 30,0% em peso
- DMAc: 70,0% em peso

Depois da membrana porosa ter sido destacada da placa de vidro, a membrana resultante foi imersa em água quente a uma temperatura de 80°C três vezes, de modo a lavar fora o DMAc, obtendo-se assim uma membrana de separação (membrana porosa). A superfície da camada de resina porosa estava na faixa de 9,2 μm x 10^4 μm foi observada com um microscópio eletrônico de varredura com uma ampliação de 10.000 vezes, sendo o valor médio dos diâmetros de todos os poros observados 0,1 μm. Em seguida, o coeficiente de filtração de água pura da membrana de separação foi avaliado, obtendo-se um valor de 50 × 10^{-9} m^3/m^2·s·Pa. As medições da quantidade de água pura filtrada foram conduzidas usando-se água purificada a uma temperatura de 25°C derivada de uma membrana de osmose reversa, com uma altura de topo de 1 m. Além disso, o desvio padrão dos diâmetros de poros foi de 0,035 μm, e a aspereza superficial de membrana foi de 0,06 μm.

EXEMPLO 1

Empregando-se a cepa SU015 produzida no exemplo de referência 1, a fermentação contínua foi conduzida com o aparelho de fermentação contínua mostrado na Figura 2, sendo produzido um ácido L-

láctico. Neste caso foi usado como meio de cultura, um meio de cultura de açúcar cru (60 g/L Yutosei (marca registrada, disponível de Muso Co., Ltd.), 1,5 g/L de sulfato de amônio). Este meio de cultura de açúcar cru foi submetido a um tratamento de esterilização com vapor d'água a alta pressão (pressão de 2 atmosferas) a uma temperatura de 121°C durante 15 minutos, sendo então usado. Como elemento do elemento de membrana de separação, foi usado um produto moldado composto de ao inoxidável e resina de polissulfona, e uma membrana plana porosa produzida no exemplo de referência 2 foi usada como membrana de separação. Como uma bomba (5) no inteiro da linha de transferência de líquido (17) foi usada uma bomba de diafragma "APLS-20" (fabricada por TACMINA Corporation), e como bomba (4) a ser usada para extrair um líquido de filtração do tanque de separação por membrana, foi usada uma bomba peristáltica. As condições operacionais nos exemplo foram ajustadas do seguinte modo:

Capacidade de tanque de fermentação: 20(L)

Membrana de separação a ser usada: membrana de filtração de PVDF (produzida no exemplo de referência 2)

Capacidade do tanque de separação por membrana: 5 (L)

Área de filtração efetiva do elemento de separação da membrana: 4000 cm^2

Ajuste da temperatura: 32 (°C)

Quantidade de extração do tanque de fermentação: ar 1 (L/min)

Velocidade de agitação do tanque de fermentação: 100 (rpm)

Ajuste do pH: ajustado para pH 5 com o emprego de hidróxido de cálcio a 8N

Velocidade de fornecimento do meio: controlado de modo variável por um sensor de nível (12) no interior do tanque de fermentação

Esterilização: esterilização com vapor d'água pressurizado a 121°C a uma pressão de 0,1 MPa durante 20 minutos em todo o tanque de separação por membrana, tanque de fermentação e no meio a ser usado.

Quantidade de fluxo da bomba (4): 3 L/hora

Diâmetro interno mínimo das linhas de transferência de líquido (15), (17): 50 mm

Vazão da bomba 5: 5 L/minuto

Velocidade linear da linha de transferência de líquido (15), (17): 4,2 cm/segundo

Fluxo 0,180 m/dia

Porcentagem de recuperação: não controlada (1% ou menos)

Como uma pré-cultura, a cepa SU014 foi submetida a cultura com agitação de um dia para o outro (pré-cultura primária conduzida primariamente) em um meio de açúcar cru de 5 mL em um tubo de ensaio. O líquido de cultura assim obtido foi inoculado em 100 mL de um meio de açúcar cru fresco e submetido a uma cultura com agitação em um frasco Sakaguchi de 500 mL a 30°C durante 24 horas (pré-cultura).

Este líquido de pré-cultura foi inoculado em um meio de açúcar bruto num total de 20 L do tanque de fermentação (1) e no interior do tanque de separação por membrana, e o interior do tanque de fermentação foi agitado por agitador fixado a ele, sendo ajustada a quantidade de extração e a temperatura e pH, depois de 50 horas de cultura, fez-se funcionar a bomba (4) pra extrair o líquido de filtração contendo o ácido L-láctico. Neste momento a pressão do líquido de cultura a fluir para dentro do tanque de separação por membrana (2) foi medida uma vez por dia, e meios de controle da quantidade de fluxo (25) (válvula borboleta) ligada à linha de desvio foi ajustada para ajustar a pressão manométrica para 0,1 MPa.

Depois de 250 horas de cultura, a turvação de levedura no tanque de fermentação, a concentração do ácido láctico como um produto no líquido de filtração e a concentração de açúcar foram medidos e foi também calculado o rendimento de ácido láctico por açúcar. Os resultados destas medições são mostrados na figura 10 e na Tabela 1. Além disso, a concentração do ácido láctico foi medida pelo método apresentado no exemplo de referência 1. A turvação de levedura foi medida por um fotômetro baseado na absorção de luz a 600 nm. Além disso, o rendimento de ácido láctico por açúcar se refere a uma relação em peso do ácido láctico produzido para o açúcar consumido e é calculado com a seguinte equação 7.

EQUAÇÃO 7

$$\text{Rendimento por açúcar (\%)} = \frac{\text{Concentração do produto químico produzido (g/L)} \times \text{Quantidade de líquido de filtração por unidade de tempo (L/h)} \times 100}{(\text{Concentração de açúcar de meio fornecido (g/L)} - \text{Concentração de açúcar no líquido de filtração (g/L)}) \times \text{Quantidade de líquido de filtração por unidade de tempo (L/h)}}$$

A concentração de açúcar foi medida por um método HPLC nas seguintes condições:

Coluna: Luna NH_2 250 x 4,6 mm (fabricada por Phenomenex Co., Ltd.)

Fase Móvel: água: acetonitrila = 25:75

Velocidade de fluxo: 0,6 mL/minuto

Método de Detecção: RI (refractômetro diferencial)

Resposta: 4

Polaridade: +

Temperatura: 30°C

EXEMPLO COMPARATIVO 1

A fermentação contínua foi conduzido do mesmo modo como no exemplo 1, exceto pelo fato de que foi usado o aparelho de fermentação contínua mostrado na figura 9, e foram medidas a turvação de levedura e a concentração do ácido láctico como um produto. O aparelho mostrado na Figura 9 tinha a mesma estrutura do aparelho da Figura 2 exceto pelo fato de que não tinham nele instalados a linha de desvio (26), os meios de controle da quantidade de fluxo (25) e as válvulas 27 e 28 que abriam/fechavam o tanque de separação por membrana.

Os resultados são apresentados na Figura 11 e na tabela 1. Além disso, foi medida a pressão de um líquido de cultura a ser fornecida ao tanque de separação por membrana durante a fermentação contínua, sendo os resultados apresentados na Figura 12.

No exemplo comparativo 1, como nenhum controle foi efetuado sobre a pressão do líquido de cultura a ser fornecida ao tanque de separação por membrana, a pressão flutuou durante a fermentação contínua e atingiu 1 MPa ou mais em 250 horas desde o início da fermentação, conforme mostrado na Figura 12. Além disso, tanto a turvação de levedura como a concentração do ácido láctico produzido foram inferiores às do exemplo 1, e o rendimento do ácido láctico por açúcar foi de 63% depois de 250 horas de fermentação contínua.

Conforme descrito acima, ajustando-se o líquido de cultura que corria para dentro do tanque de separação por membrana pela linha de desvio (26) e dos meios de controle da quantidade de fluxo (25) ligados a ela, forma confirmados efeitos inesperados, tais como uma alta concentração de fermentação da levedura, aumento da concentração de ácido láctico (produto químico) e aumento do rendimento de ácido láctico por açúcar.

EXEMPLO 2

Empregando-se o aparelho de fermentação contínua e o líquido de cultura depois da fermentação do exemplo 1, o líquido foi transportado durante 2 horas através das tubulações para ajustar cada uma das velocidades de fluxo linear nas linhas de circulação para 0,5, 1,5 e 25 cm/segundo, e forma medidas as quantidades de bactérias acumuladas que tinham se precipitado no interior das tubulações. Os resultados destas medições são mostrados na figura 6. Com base nelas, pode ser observado que, ajustando-se a velocidade linear do líquido de cultura no interior das linhas de circulação para 2,5 cm/segundo ou mais, torna-se possível se fazer o líquido de cultura circular, sem produzir a precipitação das bactérias no interior das tubulações.

EXEMPLO 3

A fermentação contínua foi conduzida do mesmo modo como no exemplo 1, exceto pelo fato de que a vazão da bomba (5) foi alterada para 10 L/minuto. Depois de 100 horas de cultura, assim como depois de 250 horas de cultura, foram medidas a turvação de levedura, a concentração do ácido láctico como um produto no líquido de filtração e a concentração de açúcar no tanque de fermentação, e foi também calculado o rendimento do ácido láctico por açúcar. Os resultados são apresentados na Tabela 1.

No caso do exemplo 3, a concentração do ácido láctico e o rendimento do ácido láctico por açúcar eram ligeiramente mis baixos em comparação com os do exemplo 1. Isto se deve provavelmente ao fato do estado de mistura do líquido no tanque de fermentação ter se alterado devido a um aumento da quantidade de fluxo de circulação (bomba (5)).

EXEMPLO COMPARATIVO 2

A fermentação contínua foi conduzida do mesmo modo como no exemplo 3, exceto pelo fato de que foi usado o aparelho de fermentação contínua mostrado na Figura 9.

Como, no exemplo comparativo 2, a pressão do líquido de cultura a ser fornecido o tanque de separação por membrana não foi controlado, a pressão no interior do tanque de separação por membrana aumentou durante a fermentação contínua, e 70 horas depois do início da fermentação ela atingiu 1 MPa ou mais. Quando ainda mais forçado, o líquido de cultura começou a vazar do tanque de separação por membrana resultando em uma incapacidade de se continuar com a fermentação contínua.

Do exemplo 3 e do exemplo comparativo 2, foi constatado que nenhuma linha de desvio (26) causaria uma falha na fermentação contínua, e ajustando-se o fluxo do líquido de cultura para dentro do tanque de separação por membrana usando-se meios de controle da quantidade de fluxo (25) ligados à linha de desvio (26), tal efeito foi obtido, de modo que a fermentação contínua pode ser estavelmente executada.

EXEMPLO 4

A fermentação contínua foi conduzida do mesmo modo como no exemplo 3 exceto pelo fato de que foi usado o aparelho de fermentação contínua mostrado na figura 7, a vazão da bomba (5) foi ajustada para 5 L/min e a vazão da bomba (16) foi ajustada para 10 L/min.

Depois de 100 horas de cultura, assim como depois de 250 horas de cultura, foram medidas a turvação de levedura, a concentração de ácido láctico como um produto no líquido de filtração e a concentração de açúcar no tanque de fermentação, sendo também calculado o rendimento de ácido láctico por açúcar. Os resultados são dados na Tabela 1.

Por este motivo, mesmo quando, no exemplo 1, a quantidade de fluxo de circulação foi aumentado do mesmo modo como no exemplo 3 pela bomba (16), controlando-se a quantidade de fluxo de retorno do líquido para dentro do tanque de fermentação pela bomba (16), foi possível se obter a concentração de ácido láctico, a turvação de levedura e o rendimento de ácido láctico por açúcar com os mesmos resultados como os do exemplo 12 antes de se alterar a quantidade de fluxo de circulação

EXEMPLO COMPARATIVO 3

A fermentação contínua foi conduzida do mesmo modo como no exemplo 4, exceto que foi usado um aparelho de fermentação contínua mostrado na figura 13. Neste caso, o aparelho mostrado na figura 13 tem a mesma estrutura que o aparelho da Figura 7 exceto que a linha de desvio (26), os meios de controle da quantidade de fluxo (25) e as válvula de membrana de separação 27 3 28 não foram instaladas nele.

No exemplo comparativo 3, como não foi efetuado nenhum controle sobre a pressão do líquido de cultura a ser fornecido ao tanque de separação por membrana, a pressão aumentou durante a fermentação contínua e 70 horas depois do início da cultura ela atingiu 1 MPa ou mais. Quando forçada ainda mais o líquido de cultura começou a vazar do tanque de separação por membrana resultada em uma falha da fermentação contínua.

EXEMPLO 5

A fermentação contínua foi conduzida do mesmo modo como no exemplo 3, exceto pelo fato de que foi usado um aparelho de fermentação contínua mostrado na figura 14. O aparelho mostrado na figura 14 tinha a mesma estrutura que o aparelho mostrado na figura 2, exceto que se permitiu que a linha de transferência de líquido (15) se abrisse em uma posição que é imersa em um líquido de cultura a ser armazenado no tanque de fermentação (1).

Depois de 100 horas da cultura, assim como depois de 250 horas de cultura foram medidas a turvação de levedura, a concentração do ácido láctico que formou um produto no líquido de filtração e a concentração de açúcar no tanque de fermentação, e foi também calculado o rendimento de ácido láctico por açúcar. Os resultados são apresentados na Tabela 1.

Consequentemente, mesmo quando, no exemplo 1, a quantidade de fluxo de circulação foi aumentada do meso como no exemplo 3 pela bomba (5), formando-se uma posição de retorno do líquido de cultura que não foi filtrado em uma posição que estava imersa no líquido de cultura no tanque de fermentação, foi possível se obter a concentração de ácido láctico, a turvação de levedura e o rendimento de ácido láctico por açúcar que apresentaram os mesmos resultados que os do exemplo 1 antes da alteração da quantidade de fluxo de circulação

EXEMPLO COMPARATIVO 4

A fermentação contínua foi conduzida do mesmo modo como no exemplo 5, exceto que foi usado um aparelho de fermentação contínua mostrado na Figura 15. Neste caso, o aparelho mostrado na Figura 15 tinha a mesma estrutura do aparelho da Figura 14 exceto que não tinham sido instalados dentro dele a linha de desvio (26), os meios de controle da quantidade de fluxo (25) e as válvulas 27 e 28 para a membrana de separação.

No exemplo comparativo 4, como nenhum controle foi efetuado sobre a pressão do líquido de cultura a ser fornecido ao tanque de separação por membrana, a pressão aumentou durante a fermentação contínua, e 70 horas depois do início da fermentação ela atingiu 1 MPa ou mais. Quando forçado ainda mais, o líquido de cultura começou a vazar do tanque de separação por membrana, resultando em uma falha na fermentação contínua. O aparelho mostrado na Figura 16 tinha a mesma

estrutura do aparelho da Figura 2, exceto que o medidor de quantidade de fluxo 30 foi instalado em seu interior. Simultaneamente, foi medida co o tempo a diferença de pressão na transmembrana, exercida sobre a membrana de separação (3), e o tempo bloqueado da membrana devido a um aumento súbito da diferença de pressão na transmembrana foi avaliado.

A alteração da diferença de pressão na transmembrana medida é mostrada na Figura 17. Durante 1000 horas a partir do início da operação, a diferença de pressão na transmembrana foi mantida em um estado estável, e com uma operação a uma porcentagem de recuperação de 1,5%, o ácido L-láctico foi produzido estavelmente por fermentação contínua durante um período prolongado.l Depois de completa a fermentação contínua, a turvação de levedura no tanque de fermentação a concentração do ácido láctico como um produto no líquido de filtração, a concentração de açúcar e o rendimento de ácido láctico por açúcar foram medidos e calculados, e estes resultados são mostrados na Tabela 2.

TABELA 1

Condições do Exemplo	Exemplo 1		Exemplo Comparativo 1		Exemplo 2	Exemplo 3		Exemplo Comparativo 2	Exemplo 4		Exemplo Comparativo 3	Exemplo 5		Exemplo Comparativo 4
Produto químico	Ácido láctico		Ácido láctico			Ácido láctico		Ácido Láctico	Ácido láctico		Ácido Láctico	Ácido láctico		Ácido Láctico
Microrganismo	SU014		SU014		SU014	SU014		SU014	SU014		SU014	SU014		SU014
Aparelho	Fig. 2		Fig. 9		Fig. 2	Fig. 2		Fig. 9	Fig. 7		Fig. 13	Fig. 14		Fig. 15
Bomba (4)	3 L/h		3 L/h		0 L/h	3 L/h		3 L/h	3 L/h		3 L/h	3 L/h		3 L/h
Bomba (5)	5 L/min		5 L/min		0,6,1,79,2,98 L/min	10 L/min		10 L/min	5 L/min		10 L/min	10 L/min		10 L/min
Bomba (16)	-		-		-	-		-	10 L/min		5 L/min	-		-
Fluxo	0,180 m/dia		0,180 m/dia		-	0,180 m/dia		0,180 m/dia	0,180 m/dia		0,180 m/dia	0,180 m/dia		0,180 m/dia
Porcentagem de recuperação	1% ou menos		1%		0,00	0,5% ou menos		0,50%	0,5% ou menos		0,50%	0,5% ou menos		0,5% ou menos
Tempo de Fermentação	100 h	250 h	100 h	250 h	-	100 h	250 h	70 h	100 h	250 h	70 h	100 h	250 h	70 h
Concentração do composto	45 g/L	45 g/L	20 g/L	35 g/L	-	40 g/L	40 g/L	-	45 g/L	45 g/L	-	45 g/L	45 g/L	-
Concentração do Microrganismo	75	200	50	100	-	60	180	-	75	200	-	75	200	-
Rendimento por Açúcar	80%	80%	55%	63%	-	72%	72%	-	80%	80%	-	80%	80%	-

EXEMPLO 6

A fermentação contínua foi conduzida do mesmo modo como no exemplo 1, exceto pelo fato de que foi usado um aparelho de fermentação contínua mostrado na Figura 16, sendo a fermentação contínua conduzida enquanto se ajustava a quantidade de fluxo de extração do líquido de filtração pela bomba (4), de modo a ajustar a porcentagem de recuperação calculada a partir do valor de um medidor de quantidade de fluxo 30 para 1,5%, e pelo fato de que, mesmo depois de 250 horas, a fermentação contínua continuava funcionando. O aparelho mostrado na Figura 16 tinha a mesma estrutura

EXEMPLO 7

A fermentação contínua foi conduzida do mesmo modo como no exemplo 6 exceto pelo fato de que a porcentagem de recuperação foi ajustada para 3,0%.

A alteração da diferença de pressão na transmembrana medida é mostrada na figura 17. Durante 800 horas a partir do início da operação, a diferença de pressão na transmembrana foi mantida em um estado estável, e mesmo durante uma operação a uma porcentagem de recuperação de 3,0%, o ácido láctico foi produzido pela fermentação contínua de modo estável durante um período prolongado. Depois de completada a fermentação contínua, a turvação de levedura no tanque de fermentação, a concentração do ácido láctico como um produto no líquido de filtração, a concentração de açúcar e o rendimento do ácido láctico por açúcar foram medidos e calculados e estes resultados são mostrados na Tabela 2.

EXEMPLO 8

A fermentação contínua foi conduzida do mesmo modo como no exemplo exceto que a porcentagem de recuperação foi ajustada para 9,9%.

A alteração da diferença da pressão na transmembrana medida é mostrada na Figura 17. Durante 550 horas a partir do início da operação, a

diferença de pressão na transmembrana foi mantida em um estado estável, e mesmo durante uma operação que tinha uma porcentagem de recuperação de 9,9% foi produzido ácido L-láctico estavelmente com fermentação contínua. Depois de completada a fermentação contínua, a turvação de levedura no tanque de fermentação, a concentração do ácido láctico como um produto no líquido de filtração, a concentração de açúcar e o rendimento de ácido L-láctico por açúcar foram medidos e calculados e estes resultados são mostrados na Tabela 2.

EXEMPLO 9

A fermentação contínua foi conduzida do mesmo modo como no exemplo 6 exceto pelo fato de que a porcentagem de recuperação foi ajustada para 12,0%.

A alteração da diferença de pressão na transmembrana medida é mostrada na Figura 17. 100 horas depois do início da operação, a diferença de pressão na transmembrana se elevou subitamente produzindo um bloqueio dos poros da membrana. Depois de completada a fermentação contínua, a turvação de levedura, a concentração do ácido láctico como um produto no líquido de filtração, a concentração de açúcar e o rendimento de ácido láctico por açúcar foram medidos e calculados, e estes resultados são mostrados na Tabela 2. Depois de 100 horas de fermentação contínua, a concentração de ácido láctico no tanque de fermentação foi de 45 g/L. Além disso, a turvação de levedura, DO 600, é aumentada para 100 e o rendimento do ácido láctico por açúcar foi de 80%.

No entanto, como se tornou difícil se conduzir a filtração, foi difícil produzir continuamente ácido L-láctico por fermentação contínua durante um período que ultrapassasse 100 horas.

Com base nos resultados dos exemplos 6 a 9, conduzindo-se uma operação de fermentação contínua com uma porcentagem de

recuperação ajustada para 10% ou menos, foram confirmados efeitos inesperados notáveis, tais como uma operação de fermentação contínua durante um período prolongado (500 horas ou mais).

TABELA 2

Condições do Exemplo	Exemplo 6	Exemplo 7	Exemplo 8	Exemplo 9
Produto Químico	Ácido láctico	Ácido láctico	Ácido láctico	Ácido láctico
Microorganismo	SUO14	SUO14	SUO14	SUO14
Aparelho	Fig. 16	Fig. 16	Fig. 16	Fig. 16
Bomba (4)	Flutuou	Flutuou	Flutuou	Flutuou
Bomba (5)	5 L/min	5 L/min	5 L/min	5 L/min
Bomba (16)	-	-	-	-
Fluxo	Flutuou	Flutuou	Flutuou	Flutuou
Porcentagem de recuperação	1, 50%	3,00%	9,90%	12,00%
Tempo de Fermentação	1000 h	800 h	550 h	100 h
Concentração do composto	45 g/L	45 g/L	45 g/L	45 g/L
Concentração do Microorganismo	320	270	250	100
Rendimento por açúcar	80%	80%	80%	80%

EXEMPLO 10

Usando-se uma cepa TR-CAD2 de *Corynebacterium glutamicum* descrita em JP-A No. 2004-222569, foi conduzida uma fermentação contínua com o aparelho de fermentação contínua mostrado na Figura 2 para ser produzida cadaverina. Como o meio de cultura, foi usado um meio de produção de cadaverina tendo uma composição mostrada na Tabela 3. Este meio de produção de cadaverina foi submetido um tratamento de esterilização com vapor d'água a alta pressão (2 atm) a 121°C durante 15 minutos, sendo então usado. Como o elemento de membrana de separação, foi usado um produto moldado composto por ao inoxidável e um resina de polissulfona, e como membrana de separação, foi usada uma membrana porosa plana produzida no exemplo de referência 2. Além disso, foi usada como uma bomba (5) no interior da linha de transferência de líquido (17), uma bomba de diafragma "APLS-20"

(fabricada por TACMINA Corporation), e como uma bomba (4) para ser usada para a extração de um líquido de filtração do tanque de separação por membrana, foi usada uma bomba peristáltica.

TABELA 3

Meio de Produção de Cadaverina	
Glicose	150 g/L
Ácido cítrico	1 g/L
Ureia	15 g/L
Fosfato ácido de potássio	0,5 g/L
Fosfato ácido de dipotássio	0,5 g/L
Sulfato de magnésio heptaidratado	0,5 g/L
L-treonina	0,8 g/L
L-metionina	0,6 g/L
L-leucina	1,5 g/L
Sulfato de ferro heptaidratado	6,0 mg/L
Sulfato de Manganês (II) monoidratado	4,2 mg/L
Biotina	1,0 mg/L
Tiamina	2,0 mg/L
Ajustado para um pH de 7,0 com amônio a 3M	

Além disso, as condições nos exemplos são as seguintes:

Capacidade do tanque de fermentação: 20 (L)

Membrana de separação a ser usada: membrana de filtração de PVDF (produzida no exemplo de referência 2)

Capacidade de tanque de separação por membrana: 5 (L)

Área de filtração efetiva do elemento de separação por membrana: 4000 cm^2

Ajuste da temperatura: 30 (°C)

Quantidade de extração do tanque de fermentação: ar 3 (L/min)

Velocidade de agitação do tanque de fermentação: 100 (rpm)

Ajuste de pH: ajustado par pH 7,0 usando-se HCl a 3M e solução aquosa de amônia a 3M

Velocidade de fornecimento de meio: controlada de modo variável por um sensor de nível no interior do tanque de fermentação

Esterilização: esterilização com vapor d'água pressurizada a

121°C a uma pressão de 0,2 MPa durante 20 minutos de todo o tanque de separação por membrana, do tanque de fermentação e do meio a ser usado

Quantidade de fluxo da bomba (4): 3 L/hora

Diâmetro interno máximo das linhas de transferência de líquido (15), (17): 50 mm

Vazão da bomba 5: 5 L/minuto

Velocidade linear das linhas de transferência de líquido (15), (17): 4,2 cm/segundo

Fluxo 0,180 m/dia

Porcentagem de recuperação: não controlado (1% ou menos)

Como uma pré-cultura, a cepa TR-CAD1 foi submetida a uma cultura com agitação de um dia para o outro (pré-cultura primária conduzida preliminarmente), em um meio de produção de cadaverina ao qual se acrescenta 5 mL de canamicina (25 µg/mL) em um tubo de ensaio. O líquido de cultura assim obtido foi inoculado em 50 mL de um meio de produção de cadaverina ao qual foi acrescentada canamicina fresca (25 µg/mL) e foi submetido a cultura de agitação em um frasco Sakaguchi de 500 mL, a 30°C durante 24 horas em condições de uma amplitude de 30 cm, a 180 rpm (pré-cultura conduzida preliminarmente). O líquido de cultura resultante foi inoculado em um meio de produção fresco de cadaverina de 1000 mL, e submetido a uma cultura com agitação em um frasco Sakaguchi de 3000 mL, a 30°C durante 24 horas (pré-cultura). Este líquido de pré-cultura foi inoculado em um meio de produção de cadaverina num total de 20 L do tanque de fermentação (1) e interior do tanque de separação por membrana, e o interior do tanque de fermentação foi agitado com um agitados fixado a ele, e a quantidade de extração, a temperatura e o pH foram ajustados e depois de 50 horas de cultura operou-se a bomba (4) de modo tal que foi extraído o líquido de filtração contendo cadaverina.

Neste momento, a pressão do líquido de cultura para fluir para dentro do tanque de separação por membrana (2) foi medida uma vez ao dia, e os meios de controle da quantidade de fluxo (25) (válvula borboleta) ligados à linha de desvio (26) foram ajustados, de modo que se ajustasse a pressão manométrica para 0,1 MPa.

Depois de 250 horas de cultura a turvação de levedura no tanque de fermentação, a concentração de cadaverina como um produto no líquido de filtração e a concentração de açúcar foram medidos, sendo também calculado o rendimento de cadaverina por açúcar. Estes resultados são mostrados na Figura 18 e na Tabela 4. A concentração de cadaverina foi de 2,5 g/L. Além disso, foi medida a turvação de *Corynebacterium* por um fotômetro à base de absorção de luz a 600 nm. Além disso, o rendimento de cadaverina por açúcar foi de 3%.

A concentração de cadaverina foi medida pelo seguinte método:

(Método de Análise da concentração de cadaverina por HPLC)

- Coluna a ser usada: CAPCELL PAK C18 (fabricada por Shiseido Co., Ltd.)

- Fase Móvel: solução aquosa a 0,1% (peso/peso) de ácido fosfórico: acetonitrila = 4,5:5,5

- Detecção: UV 360 nm

- Pré-tratamento da amostra: A uma amostra de analise (25 µL) foram acrescentados 25 µL de 1,4-diaminobutano (0,03 M) servindo como uma substância padrão interna, 150 µL de acetato ácido de sódio (0,075 M) e uma solução em etanol de 2,4-dinitro fluorbenzeno (0,2 M) e misturou-se, mantendo-se a 37°C durante uma hora.

Depois da solução de reação (50 µL) ter sido dissolvida em 1 mL de acetonitrila, a solução resultante foi centrifugada a 10.000 rpm durante 5 minutos, sendo o seu fluido sobrenadante (10 µL) então submetido a uma análise por HPLC.

EXEMPLO COMPARATIVO 5

Uma fermentação contínua foi conduzida do mesmo modo como no exemplo 10, exceto pelo fato de que foi usado o aparelho mostrado na figura 9. Foram medidas a turvação de *Corynebacterium* e a concentração de cadaverina como um produto produzido. Neste caso, o aparelho mostrado na Figura 9 tinha a mesma estrutura que o aparelho mostrado na Figura 2, exceto pelo fato de que não foram instalados nele a linha de desvio (26), os meios de controle da quantidade de fluxo (25) e as válvulas que abrem/fecham o tanque de separação por membrana (2)7 e 28.

Os resultados são apresentados na Figura 19 e na Tabela 4. Além disso, foi medida a pressão de um líquido de cultura a ser fornecido ao tanque de separação por membrana durante a fermentação contínua e os resultados são mostrados na Figura 20.

TABELA 4

Condições do Exemplo	Exemplo 10	Exemplo Comparativo 5
Produto químico	Cadaverina	Cadaverina
Microorganismo	TR-CAD1	TR-CAD1
Aparelho	Fig. 2	Fig. 9
Bomba (4)	3 L/h	3 L/h
Bomba (5)	5 L/min	5 L/min
Bomba (16)	-	-
Fluxo	0,180 m/dia	0,180 m/dia
Porcentagem de recuperação	1% ou menos	1%
Tempo de fermentação	250 h	250 h
Concentração do Composto	3,5 g/L	1, 2 g/L
Concentração do Microorganismo	250	100
Rendimento por Açúcar	3%	1%

No exemplo comparativo 5, como nenhum controle foi efetuado sobre a pressão do líquido de cultura a ser fornecido ao tanque de separação

por membrana, a pressão aumentou durante a fermentação contínua, e 225 horas depois do início da fermentação ela atingiu 1 MPa ou mais conforme mostrado na Figura 20. Além disso, tanto a turvação de *Corynebacterium* como a concentração de cadaverina caíram abaixo das do exemplo 10. O rendimento de cadaverina por açúcar foi de 1,0%.

Conforme foi descrito acima, ajustando-se o líquido de cultura de fluxo para dentro do tanque de separação por membrana pela linha de desvio (26) e os meios de controle da quantidade de fluxo (25) ligados a ela, forma confirmados efeitos inesperados, tais como uma fermentação a alta concentração de *Corynebacterium*, aumento da concentração de cadaverina (produto químico) e aumento do rendimento de cadaverina por açúcar.

EXEMPLO 11

Usando-se a cepa delta-HOM de *Corynebacterium glutamicum* descrita em JP-A No. 2008-212138, a fermentação contínua foi conduzida pelo aparelho de fermentação contínua mostrado na Figura 2 para a produção de L-lisina. Como meio de cultura, foi usado um meio de produção de L-lisina que tinha uma composição mostrada na Tabela 5. Este meio de produção de L-lisina foi submetido a um tratamento de esterilização com vapor d'água a alta pressão (2 atm) a 121°C durante 15 minutos, sendo então usado. Como elemento de membrana de separação, foi usado um produto moldado composto de aço inoxidável e resina de polissulfona, e como membrana de separação, foi usada a membrana porosa plana produzida no exemplo de referência 2. Além disso, como a bomba (5) no interior da linha de transferência de líquido (17) foi usada uma bomba de diafragma "APLS-20" (fabricada por TACMINA Corporation), e como bomba (4) a ser usada para a extração de um líquido de filtração do tanque de separação por membrana, foi usada uma bomba peristáltica.

TABELA 5

Meio de Produção de L—lisina		
Glicose	100	g/L
Ureia	1	g/L
Extrato de Levedura	5	g/L
Fosfato ácido de dipotássio	2,5	g/L
Sulfato de magnésio heptaidratado	0,75	g/L
Cloreto de cálcio diidratado	0,05	g/L
Sulfato de ferro heptaidratado	0,05	g/L
Sulfato de manganês pentaidratado	13	ppm
Sulfato de cobre pentaidratado	6,3	Ppm
Sulfato de zinco heptaidratado	13	Ppm
Cloreto de níquel hexaidratado	5	Ppm
Cloreto de cobalto hexaidratado	1,3	Ppm
Molibdênio	1,3	Ppm
B-alanina	23	Ppm
Ácido nicotínico	14	Ppm
Biotina	0,5	Ppm
Tiamina	7	ppm

Além disso, as condições nos exemplo são explicadas do seguinte modo:

Capacidade do tanque de fermentação: 20 (L)

Membrana de separação a ser usada: membrana de filtração de PVDF (produzida no exemplo de referência 2)

Capacidade do tanque de separação por membrana: 5 (L)

Área de filtração efetiva do elemento de separação por membrana: 4000 cm^2

Ajuste da temperatura: 30 (°C)

Quantidade de extração do tanque de fermentação: ar 5 (L/min)

Velocidade de agitação do tanque de fermentação: 300 (rpm)

Ajuste do h: ajustado para pH 7,3 usando-se HCl a 3M e solução aquosa de amônia a 3M

Velocidade de fornecimento do meio: controlado de modo variável por um sensor de nível no interior do tanque de fermentação

Esterilização: esterilização por vapor d'água pressurizado a 121°C

a 0,2 MPa durante 20 minutos sobre todo o tanque de separação por membrana, tanque de fermentação e o meio a ser usado

Quantidade de fluxo da bomba (4): 3 L/hora

Diâmetro interno das linhas de transferência de líquido (15), (17): 50 mm

Vazão da bomba 5: 5 L/minuto

Velocidade linear das linhas de transferência de líquido (15), (17): 4,2 cm/segundo

Fluxo: 0,180 m/dia

Porcentagem de recuperação: não controlado 91% ou menos).

Como uma pré-cultura a cepa delta-HOM foi submetida a cultura de agitação de um dia para o outro (pré-cultura primária preliminarmente conduzida) em um meio BY de 5 mL (0,5% de extrato de levedura, 0,7% de extrato de carne, 1% de heptona, 0,3% de cloreto de sódio) em um tubo de ensaio. O líquido de cultura assim obtido foi inoculado em 50 mL de meio de produção de L-lisina e submetido, em um frasco Sakaguchi de 500 mL, a cultura com agitação a 30°C durante 24 horas em condições de uma amplitude de 30 cm a 180 rpm (pré-cultura preliminarmente conduzida). O líquido de cultura resultante foi inoculado em 1000 mL de um meio de produção de L-lisina fresco, e submetida a cultura com agitação, em u frasco Sakaguchi de 3000 mL a 30°C durante 24 horas (pré-cultura). Este líquido de pré-cultura foi inoculado em um total de 20 L de meio de produção de L-lisina do tanque de fermentação (1) e no interior do tanque de separação por membrana e o interior do tanque de fermentação foi agitado por um agitador fixado a ele, e a quantidade de extração foi ajustada, e a temperatura e o pH foram ajustados e depois de 50 horas de cultura, a bomba (4) foi operada de modo que foi extraído um líquido de filtração contendo L-lisina.

Neste momento a pressão do líquido de cultura que corria par o tanque de separação por membrana (2) foi medida uma vez ao dia, e os meios de controle da quantidade de fluxo (25) (válvula borboleta) ligados à linha de desvio (26) foram ajustados para que a pressão manométrica fosse ajustada para 0,1 MPa.

Depois de 250 horas de cultura foram medidas a turvação de *Corynebacterium* no tanque de fermentação, a concentração de L-lisina como um produto no líquido de filtração e a concentração de açúcar, sendo também calculado o rendimento de L-lisina por açúcar. Os resultados destas medições são dados na Figura 21 e na Tabela 6. A concentração de L-lisina foi de 6,0 g/L. Além disso, a turvação de *Corynebacterium* foi medida por um fotômetro com base na absorção de luz a 600 nm. Além disso, o rendimento de L-lisina por açúcar foi de 5,5%. A concentração de L-lisina foi medida usando-se o mesmo método de medição que foi usado com a concentração de cadaverina.

EXEMPLO COMPARATIVO 6

A fermentação contínua foi conduzida do mesmo modo como no exemplo 11, exceto pelo fato de que se usou o aparelho mostrado na Figura 9. A turvação de *Corynebacterium* e a concentração de cadaverina como um produto foi medida. Neste caso, o aparelho mostrado na Figura 9 tinha a mesma estrutura que é mostrada na figura 2, exceto pelo fato de que não foram instalados nele a linha de desvio (26), os meios de controle da quantidade de fluxo (25) e as válvulas 27, 28 que abrem/fecham o tanque de separação por membrana.

Os resultados são mostrados na Figura 22 e na Tabela 6. Além disso, a pressão de um líquido de cultura a ser fornecido ao tanque de separação por membrana durante a fermentação contínua foi medida, e os resultados são mostrados na Figura 23.

TABELA 6

Condições do Exemplo	Exemplo 11	Exemplo Comparativo 6
Produto químico	L-lisina	L-lisina
Microorganismo	delta-HOM	delta-HOM
Aparelho	Fig. 2	Fig. 9
Bomba (4)	3 L/h	3 L/h
Bomba (5)	5 L/min	5 L/min
Bomba (16)	-	-
Fluxo	0,180 m/dia	0,180 m/dia
Porcentagem de recuperação	1% ou menos	1%
Tempo de fermentação	250 h	250 h
Concentração do Composto	6,0 g/L	1, 2 g/L
Concentração do Microorganismo	250	100
Rendimento por Açúcar	5,5%	1,1%

No exemplo comparativo 6, como nenhum controle foi efetuado sobre a pressão do líquido de cultura a ser fornecido ao tanque de separação por membrana, a pressão flutuo durante a fermentação contínua, e 225 horas depois do início da fermentação ela atingiu 1 MPa ou mais conforme mostrado na Figura 23. Além disso, tanto a turvação de *Corynebacterium* como a concentração de L-lisina desceu abaixo das do exemplo 11. O rendimento de L-lisina por açúcar foi de 1,1%.

Conforme descrito acima, ajustando-se o líquido de cultura em fluxo para dentro do tanque de separação por membrana pela linha de desvio (26) e pelos meios de controle da quantidade de fluxo (25) ligados a ela, são confirmados os efeitos inesperados tais como fermentação a alta concentração de *Corynebacterium*, um aumento da concentração de L-lisina (produto químico) e aumento do rendimento de L-lisina por açúcar.

APLICABILIDADE INDUSTRIAL

A presente invenção pode ser adequadamente aplicada a

produção de diversos produtos químicos obtidos pela fermentação de microorganismos, tais como alcoóis, ácidos orgânicos, aminoácidos, ácidos nucleicos, enzimas, antibióticos e proteínas de recombinação.

EXPLICAÇÃO DOS NÚMEROS DE REFERÊNCIA

1. Tanque de fermentação;

2, 2'. Tanque de separação por membrana;

3, 3'. Membrana de separação;

4. Bomba de filtração;

5. Bomba;

6. Bomba de fornecimento de meio;

7. Eixo de agitação;

8. Linha de fornecimento de gás;

9. Sensor de pH;

10. Bomba neutralizadora;

11. Ajustador de temperatura;

12. Sensor de nível;

13. Unidade de abertura de pressão atmosférica;

14A. Ponto de junção;

14B. Ponto de ramificação;

15. Linha de transferência de líquido (retorno do fluido de cultura que não foi filtrado ao tanque de fermentação);

16. Bomba;

17. Linha de transferência;

18. Placa de suporte;

19. Elemento de passagem de fluxo;

20. Membrana de separação;

21. Seção côncava;

22. Tubulação de coleta de líquido;

23. Camada de vedação de resina superior;

24. Camada de vedação de resina inferior;

25. Meios de controle da quantidade de fluxo;

26. Linha de desvio;

27, 27'. Válvula de abertura/fechamento do tanque de separação por membrana (líquido de cultura);

28, 28'. Válvula de abertura/fechamento do tanque de separação por membrana (líquido de cultura não filtrado);

29. Medidor de pressão;

30. Medidor da quantidade de fluxo.

REIVINDICAÇÕES

1. MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UM PRODUTO QUÍMICO, caracterizado pelo fato de que inclui as etapas de:

- cultura de microorganismos ou de células em cultura em um tanque de fermentação;

- transferência de um líquido de cultura do tanque de fermentação para um tanque de separação por membrana de modo a filtrar o líquido de cultura através de uma membrana de separação; e,

- coleta de um produto de fermentação a partir de um líquido de filtração como o produto químico, enquanto se faz refluir um líquido de cultura que não foi filtrado de modo a ser acrescentado ao líquido de cultura em um lado a montante do tanque de separação por membrana, em que uma porção do líquido de cultura a ser transferido do tanque de fermentação seja desviada do tanque de separação por membrana dependendo de uma pressão do lado do influxo do líquido de cultura do tanque de separação por membrana.

2. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que uma quantidade de fluxo do líquido de cultura a ser desviada do tanque de separação por membrana é controlada de tal modo que a pressão manométrica no lado de influxo do líquido de cultura do tanque de separação por membrana é ajustada para 1 MPa ou menos.

3. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que uma porção do líquido de cultura que não foi filtrado é refluída de modo a ser acrescentada ao líquido de cultura no tanque de fermentação, enquanto o resto da porção do líquido de cultura que não foi filtrado é refluído de modo a ser acrescentado a um líquido de cultura localizado entre o tanque de fermentação e o tanque de separação por membrana.

4. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que uma quantidade de fluxo do líquido de cultura que não foi filtrado e que será refluído seja acrescentada ao líquido de cultura localizado entre o tanque de fermentação e o tanque de separação por membrana, e uma quantidade de fluxo do líquido de cultura que não foi filtrado e que será refluído seja acrescentada ao líquido de cultura no tanque de fermentação sejam independentemente controladas.

5. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 3 ou 4, caracterizado pelo fato de que uma relação de uma quantidade de fluxo do líquido de cultura que não foi filtrado e que será refluído seja acrescentada ao líquido de cultura no tanque de fermentação para uma quantidade de fluxo do líquido de cultura que não foi filtrado e que será refluído seja acrescentada ao líquido de cultura localizado entre o tanque de fermentação e o tanque de separação por membrana é ajustada para 1 ou menos.

6. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que cada uma dentre a velocidade linear do líquido de cultura a ser transportado do tanque de fermentação para o tanque de separação por membrana, a velocidade linear do líquido de cultura que não foi filtrado e que será refluído do tanque de separação por membrana de modo a ser acrescentado ao líquido de cultura do lado a montante do tanque de separação por membrana e a velocidade linear do líquido de cultura que se permite que seja desviado do tanque de separação por membrana é ajustada para 2,5 cm/seg ou mais.

7. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que uma quantidade de líquido de cultura a fluir para dentro do tanque de separação por membrana e/ou uma quantidade de líquido de filtração proveniente da membrana de separação são ajustadas de modo que a porcentagem de recuperação da quantidade de líquido de filtração

proveniente da membrana de separação para a quantidade de líquido de cultura para fluir para dentro do tanque de separação por membrana é ajustada para 10,0% ou menos.

8. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que uma relação do volume do líquido de cultura no tanque de fermentação para o volume de líquido de cultura no tanque de separação por membrana é ajustada a uma faixa de 4 ou mais até 100 ou menos.

9. APARELHO DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA, caracterizado pelo fato de que inclui:

- um tanque de fermentação para cultivar microorganismos ou células em cultura;

- um tanque de separação por membrana que tem uma membrana de separação usada para coletar um produto de fermentação produzido em um líquido de cultura proveniente do tanque de fermentação;

- uma linha de circulação que conecta o tanque de fermentação com o tanque de separação por membrana de modo a transferir o líquido de cultura para o tanque de separação por membrana, e fazer refluir um líquido de cultura que não foi filtrado através da membrana de separação de modo a ser acrescentada ao líquido de cultura do lado a montante do tanque de separação por membrana;

- meios de transferência de líquido de cultura instalados na linha de circulação, em que essa estrutura ainda inclui uma linha de desvio para o tanque de separação por membrana;

- meios de detecção para uma pressão do lado do influxo do líquido de cultura do tanque de separação por membrana; e

- meios de controle da quantidade de fluxo instalados na linha de desvio.

10. APARELHO, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que os meios de controle da quantidade de fluxo são operados em resposta ao resultado de detecção dos meios de detecção.

11. APARELHO, de acordo com uma das reivindicações 9 ou 10, caracterizado pelo fato de que inclui ainda meios de detecção de velocidade linear para a linha de circulação, de modo que os meios de controle da quantidade de fluxo e/ou os meios de transferência do líquido de cultura sejam operados em resposta ao resultado da detecção dos meios de detecção da velocidade linear.

12. APARELHO, de acordo com uma das reivindicações 9 a 11, caracterizado pelo fato de que o tanque de separação por membrana é ajustado em um circuito de circulação que tem meios de transferência de líquido diferentes dos meios de transferência do líquido de cultura, que é independente do tanque de fermentação.

13. APARELHO, de acordo com uma das reivindicações 9 a 12, caracterizado pelo fato de que a linha de circulação tem uma abertura em uma posição que está imersa com o líquido de cultura a ser armazenado no tanque de fermentação.

14. APARELHO, de acordo com uma das reivindicações 9 a 13, caracterizado pelo fato de que a relação do volume do tanque de fermentação para o volume do tanque de separação por membrana é ajustada em uma faixa de 4 ou mais a 100 ou menos.

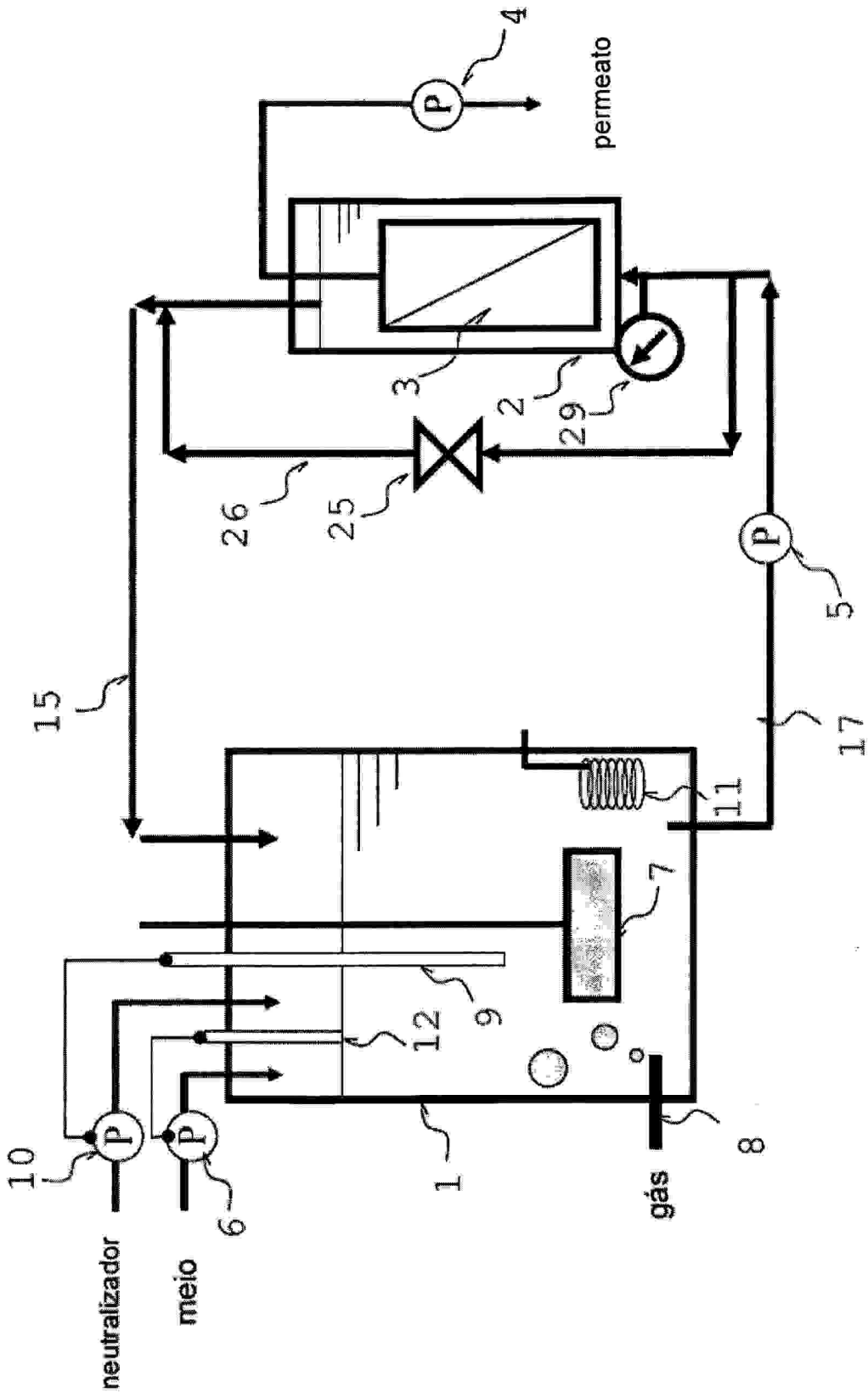

4
permeato
3
2
29
26
25
15
5
17
11
7
12
9
10
6
1
8
neutralizador
meio
gás

Fig. 1

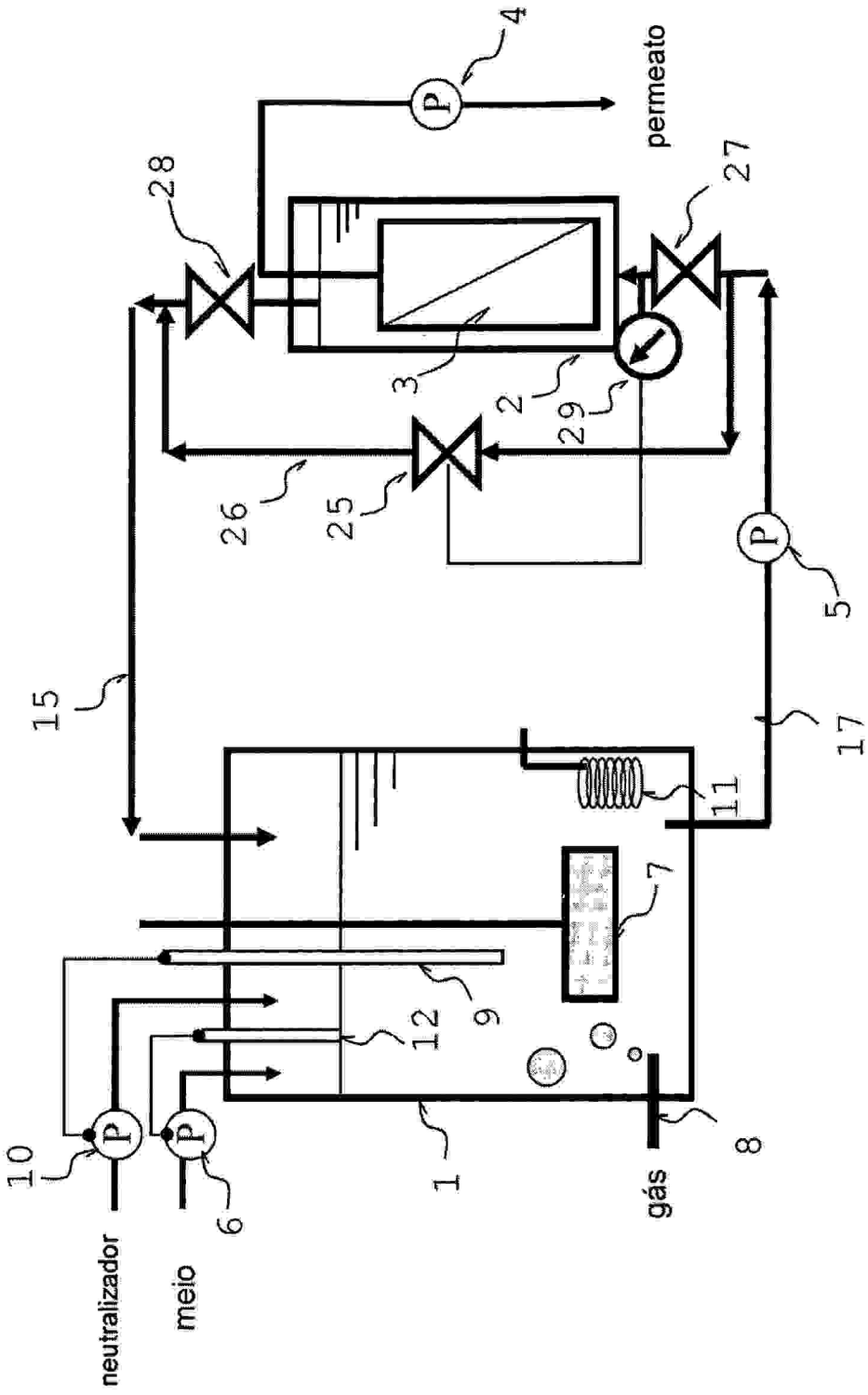

4
permeato
28
27
3
2
29
26
25
5
15
17
11
7
12
9
10
1
8
neutralizador
meio
6
gás

Fig. 2

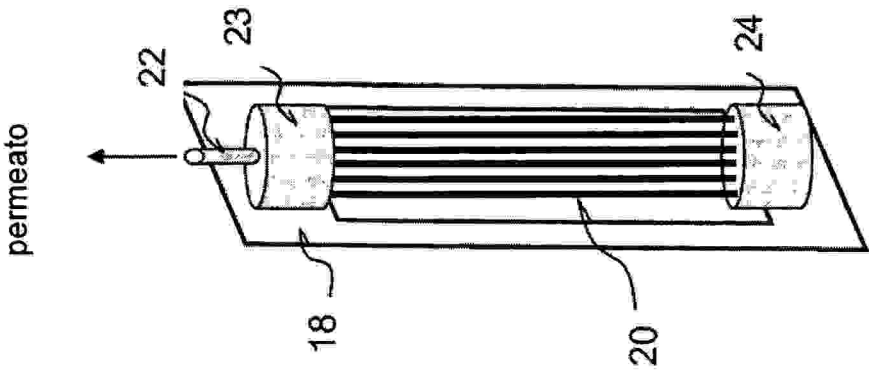


Fig. 4

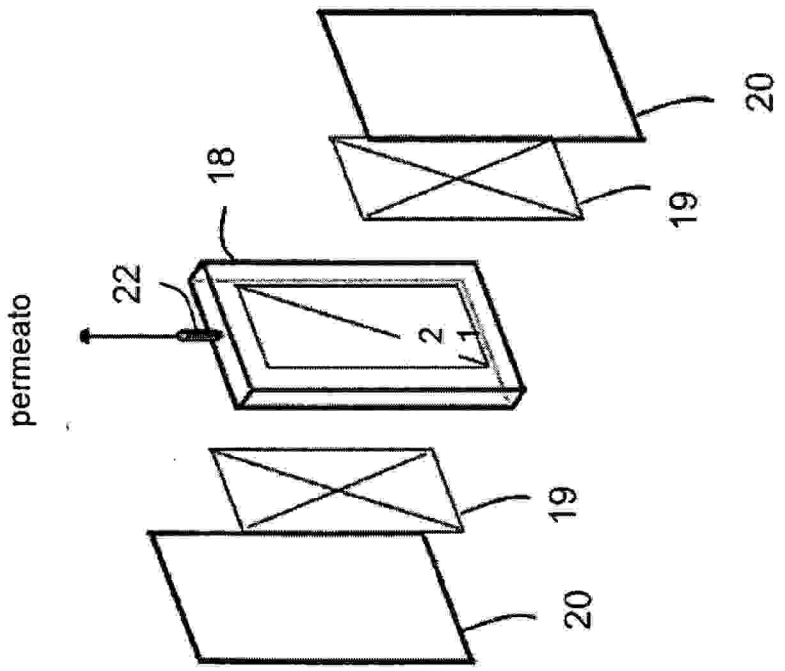


Fig. 3

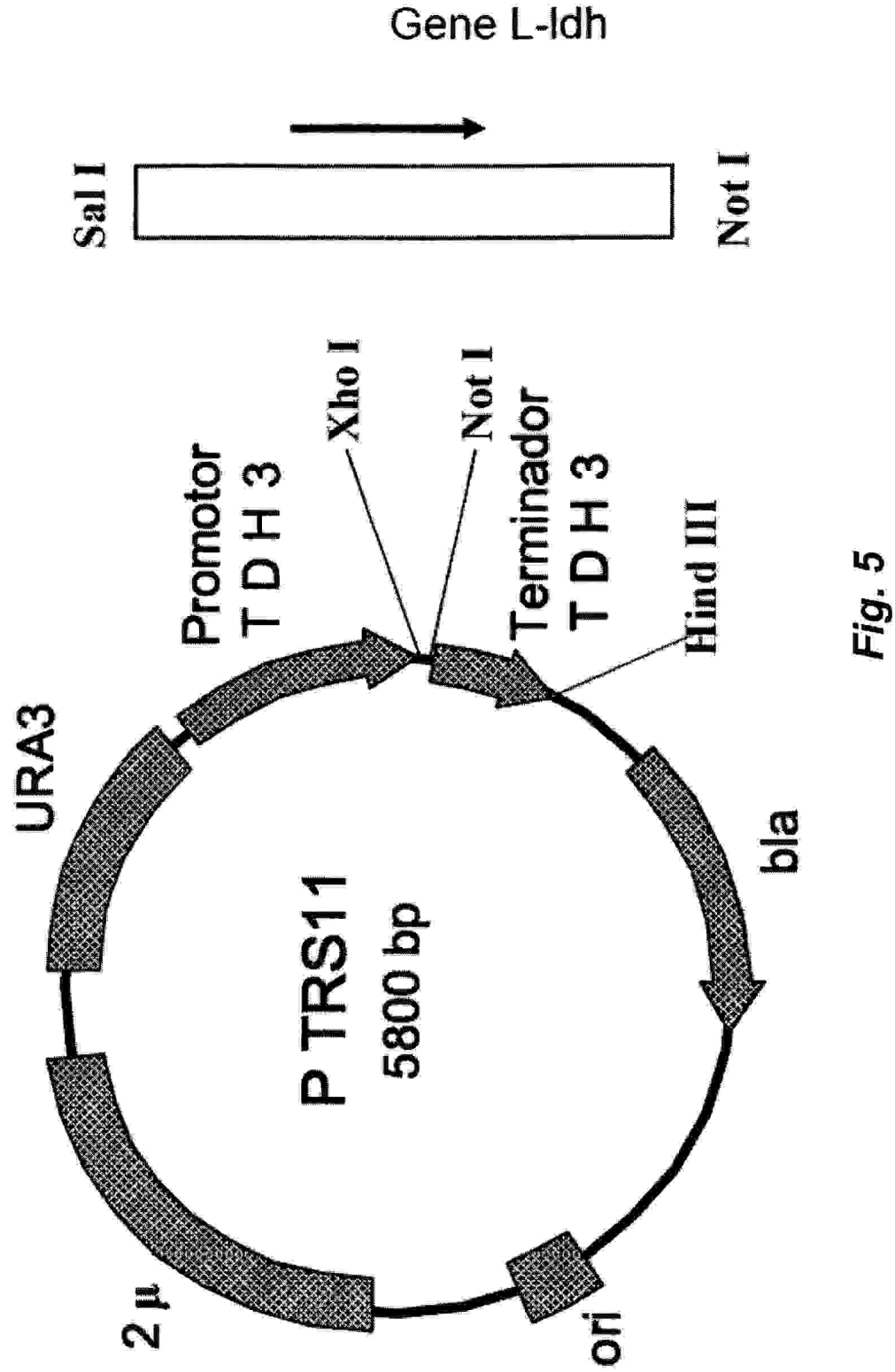

Gene L-ldh
Sal I
Not I
Promotor
T D H 3
Xho I
Not I
Terminador
T D H 3
Hind III
URA3
P TRS11
5800 bp
bla
2 µ
ori

Fig. 5

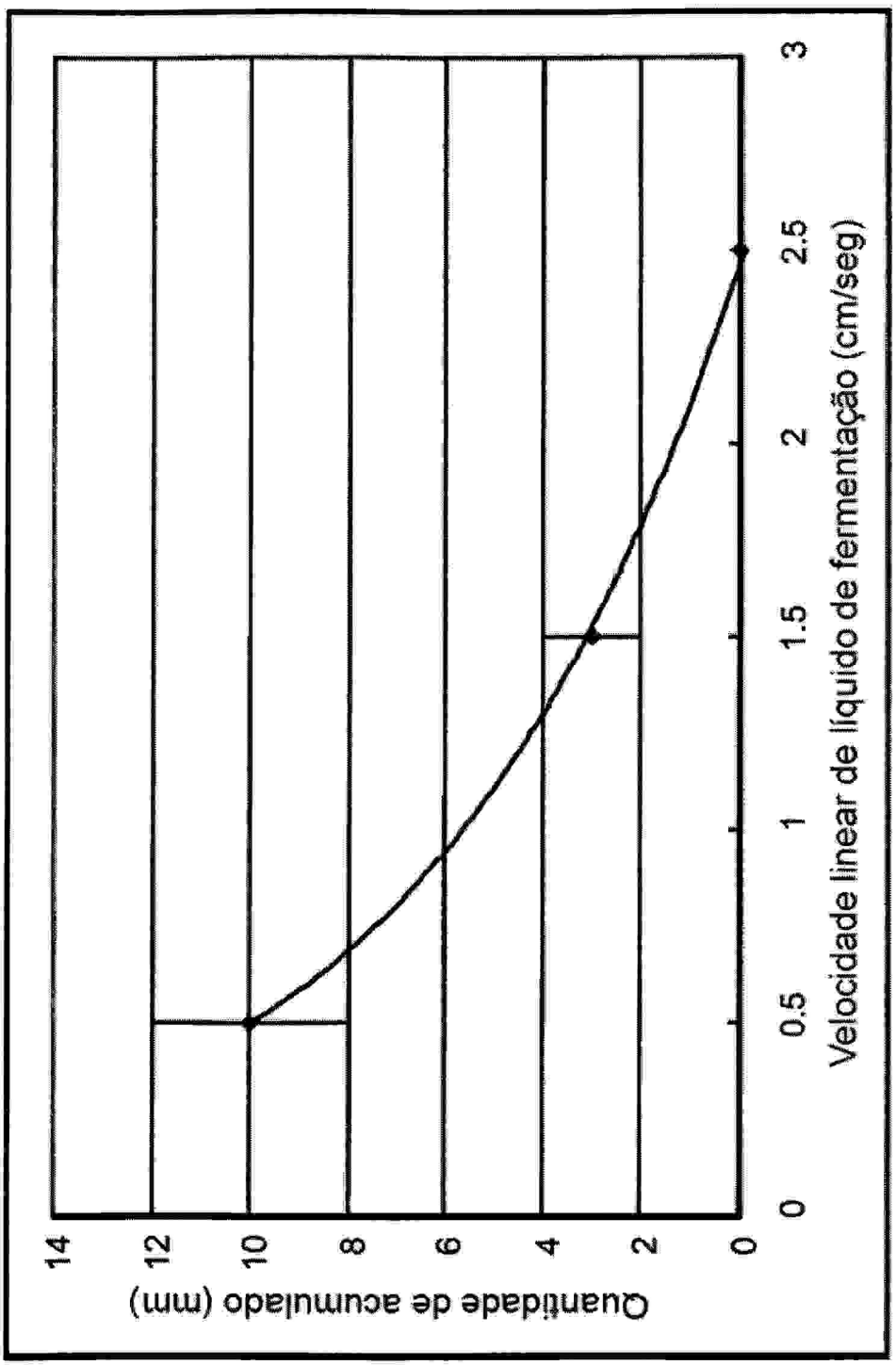

Quantidade de acumulado (mm)
14
12
10
8
6
4
2
0
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
Velocidade linear de líquido de fermentação (cm/seg)

Fig. 6

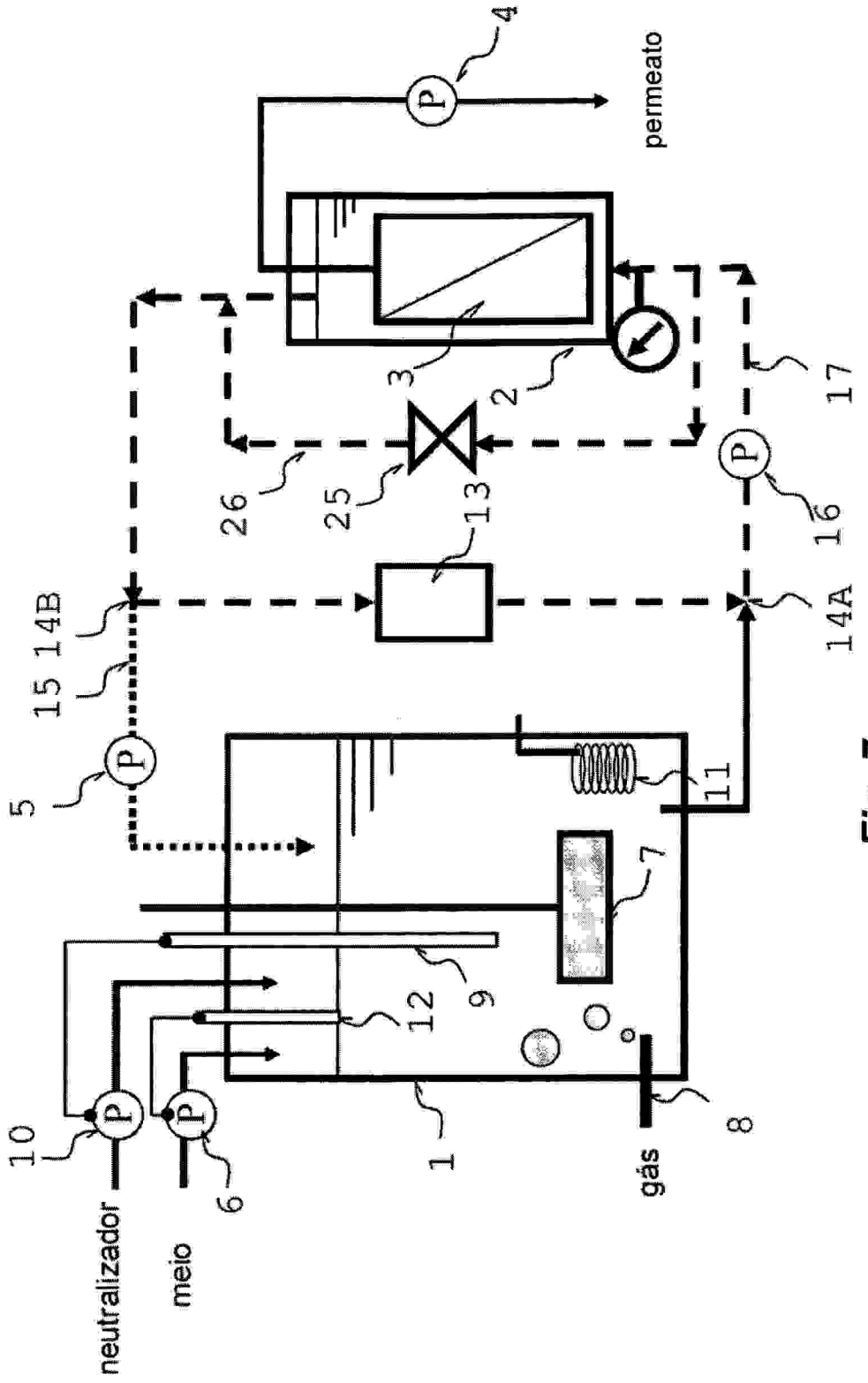

4
permeato
3
2
17
26
25
13
16
14B
15
14A
5
11
7
12
9
10
1
8
6
neutralizador
meio
gás

Fig. 7

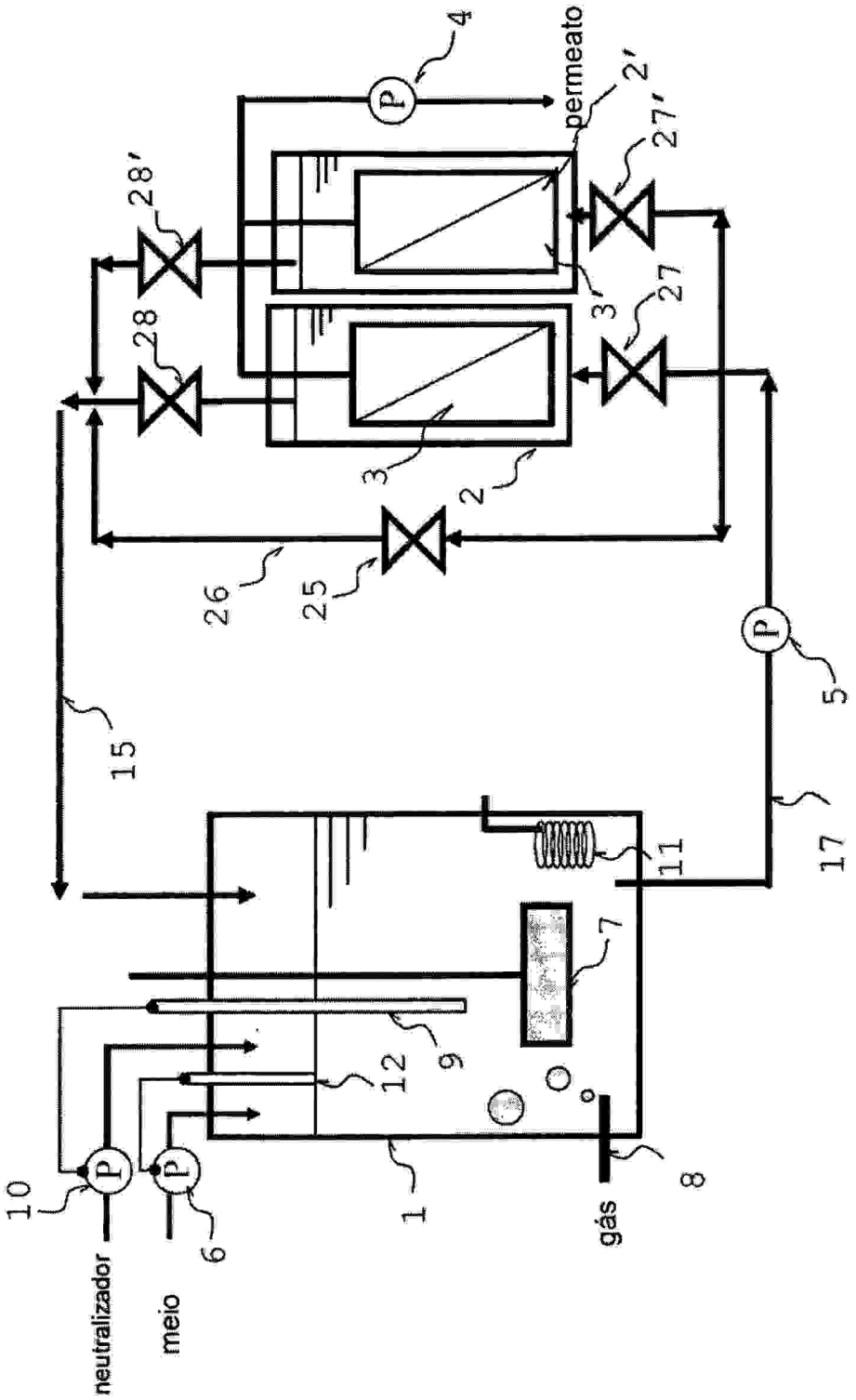

4
permeato
2'
27'
28'
3'
27
28
3
2
26
25
15
5
17
11
7
12
9
10
neutralizador
meio
6
1
gás
8

Fig. 8

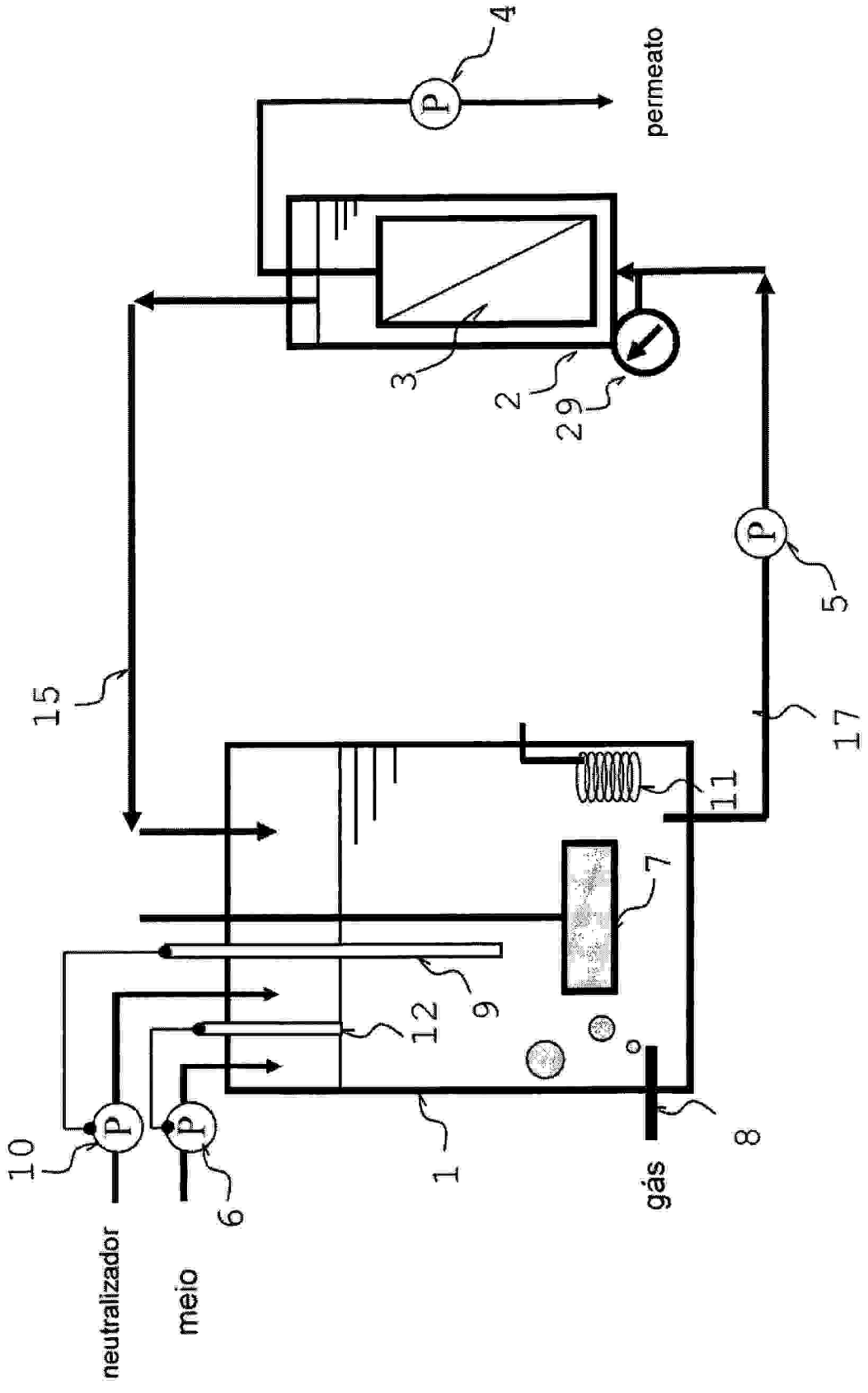


Fig. 9

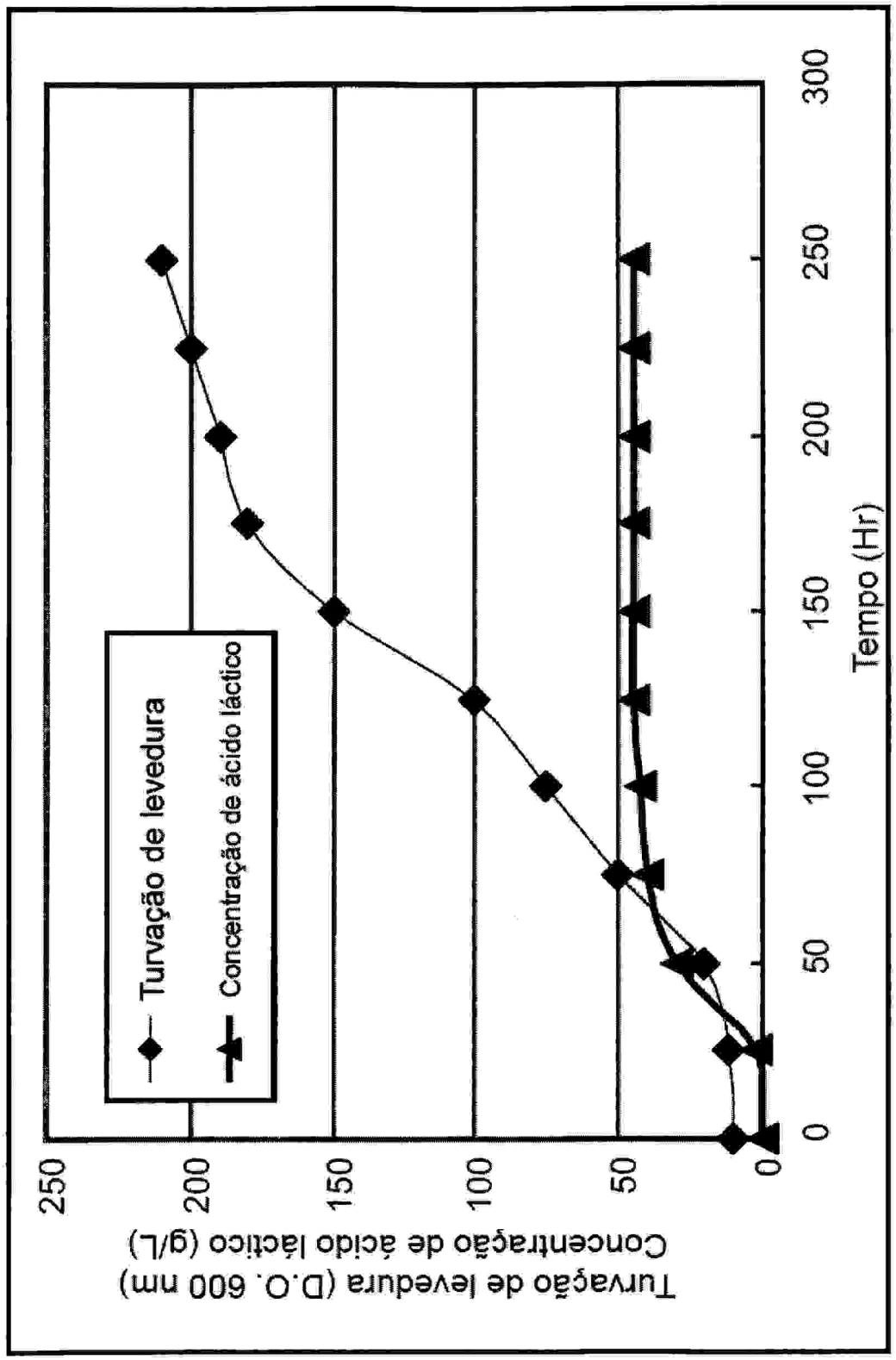

Turvação de levedura (D.O. 600 nm)
Concentração de ácido láctico (g/L)
250
200
150
100
50
0
0
50
100
150
200
250
300
Tempo (Hr)
Turvação de levedura
Concentração de ácido láctico

Fig. 10

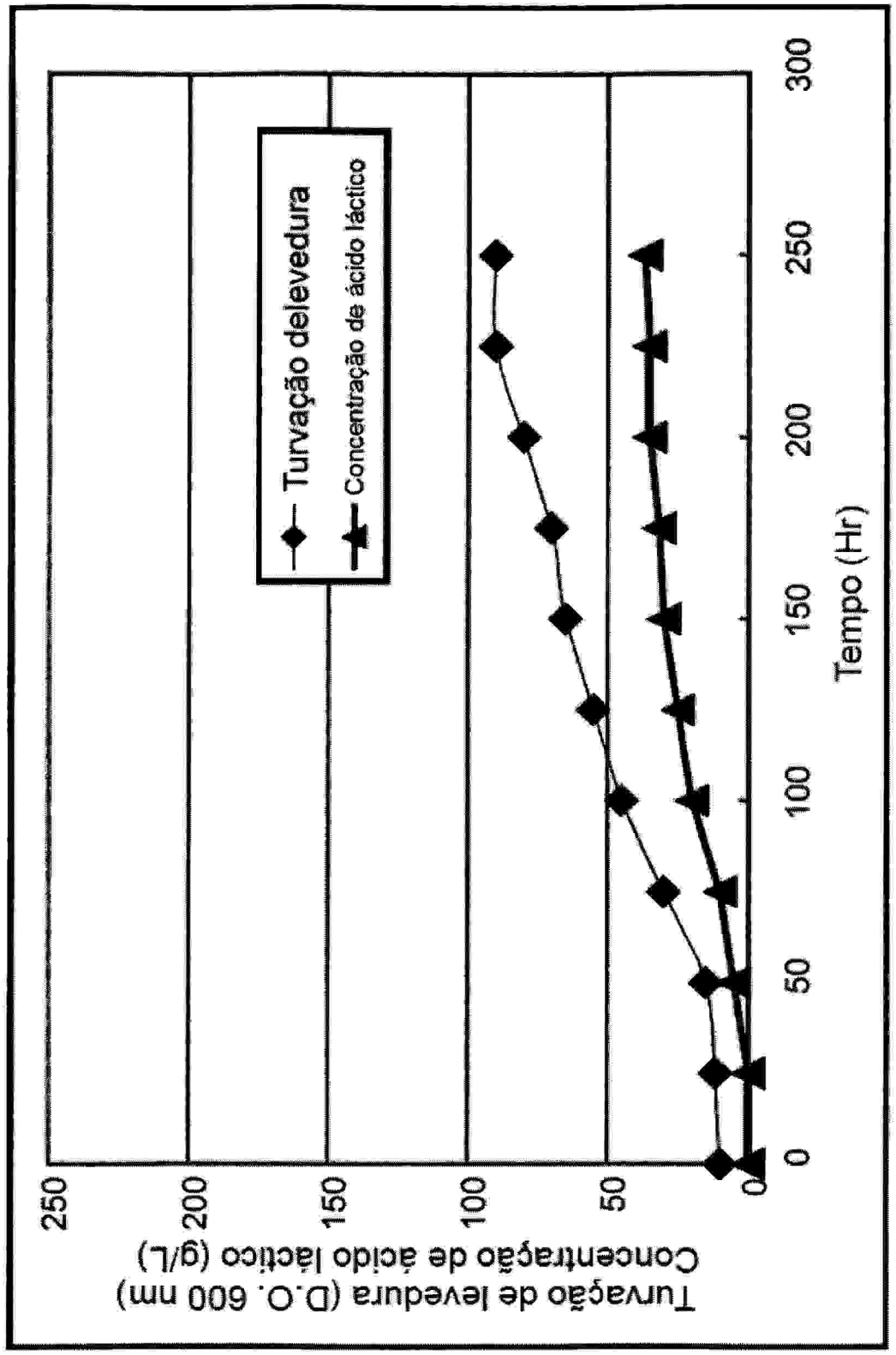

Turvação de levedura (D.O. 600 nm)
Concentração de ácido láctico (g/L)
250
200
150
100
50
0
0
50
100
150
200
250
300
Tempo (Hr)
Turvação delevedura
Concentração de ácido láctico

Fig. 11

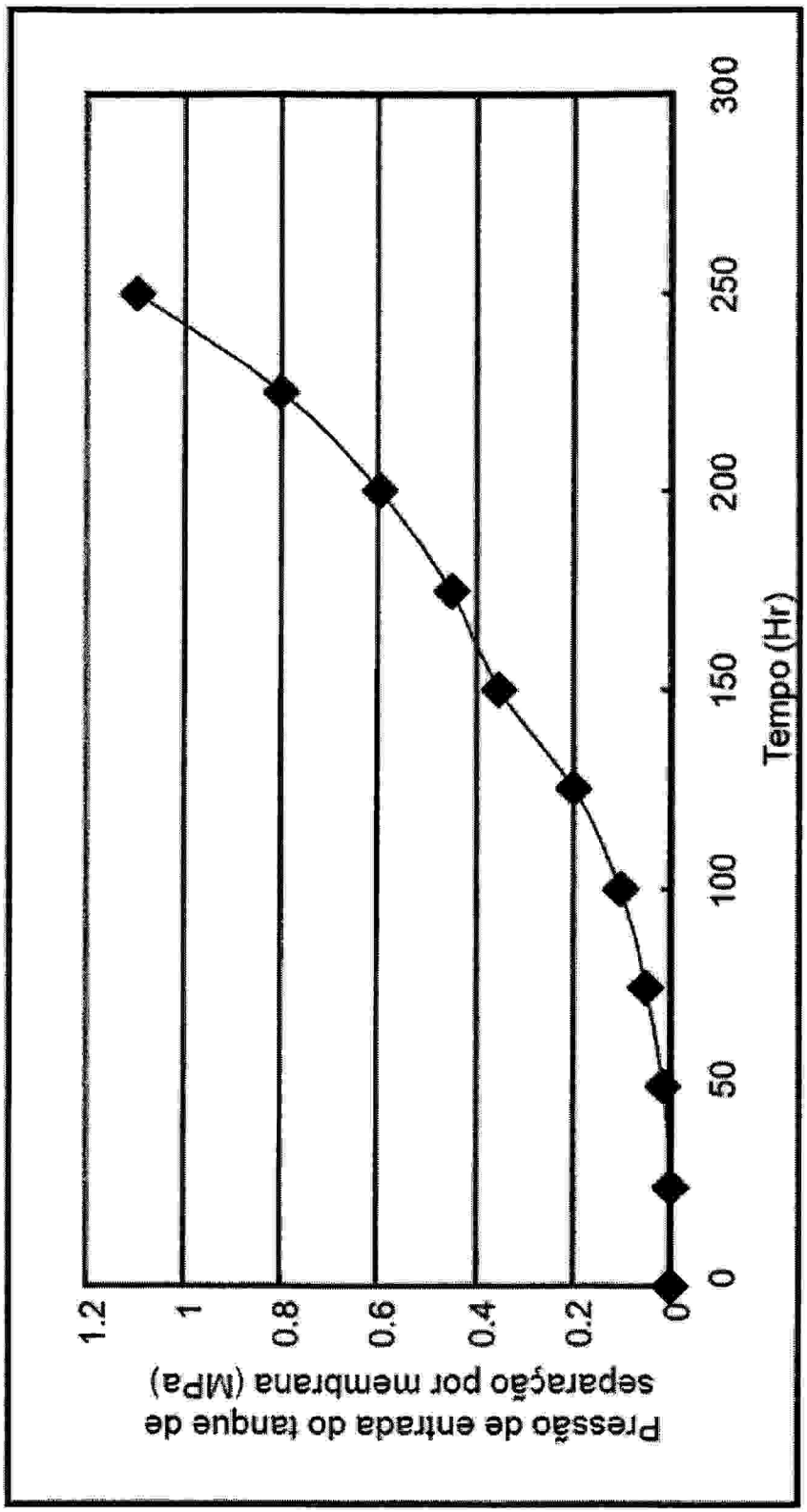

Pressão de entrada do tanque de separação por membrana (MPa)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
50
100
150
200
250
300
Tempo (Hr)

Fig. 12

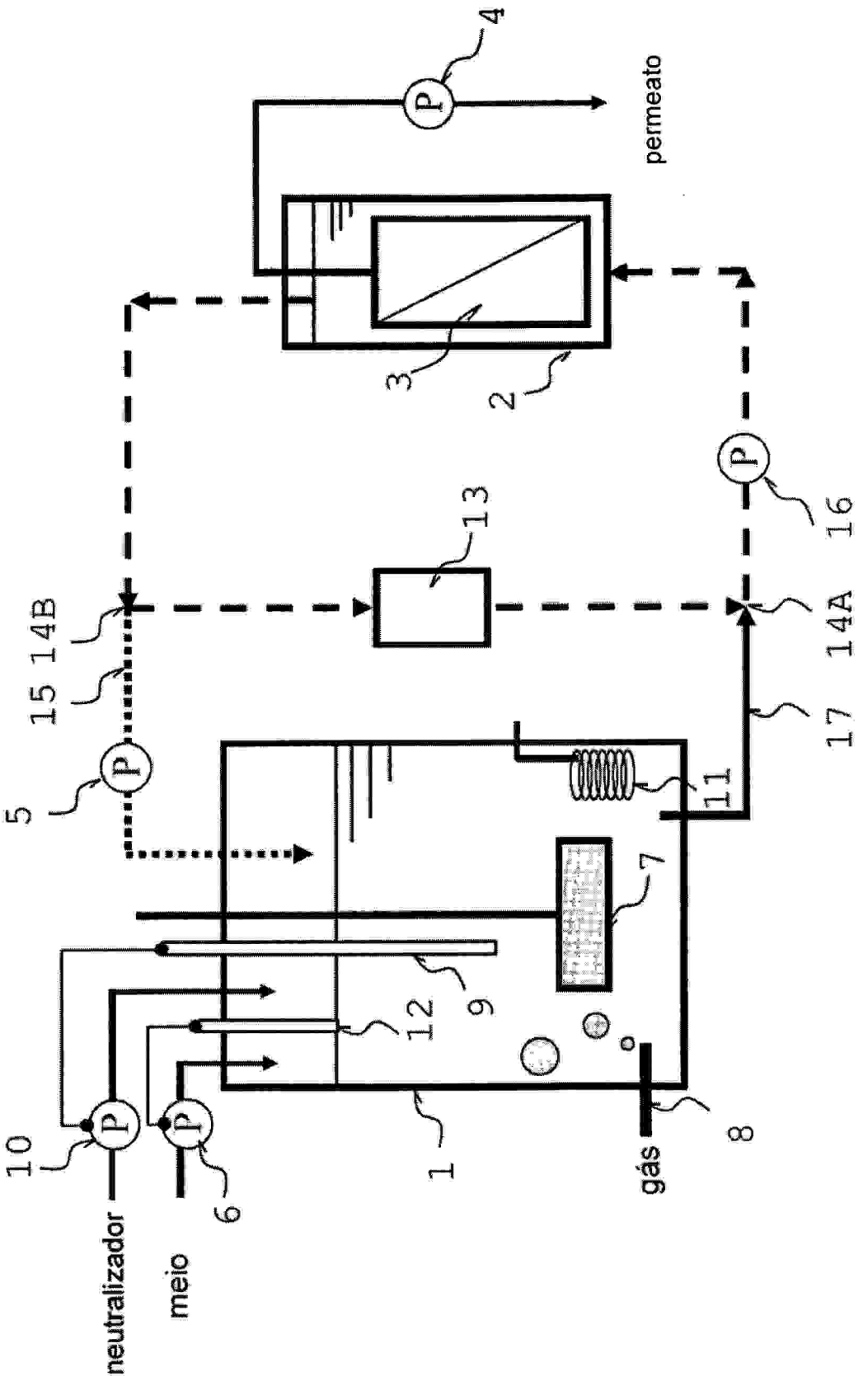

4
P
permeato
3
2
13
16
14A
17
15
14B
5
11
7
9
12
10
6
1
8
gás
meio
neutralizador

Fig. 13

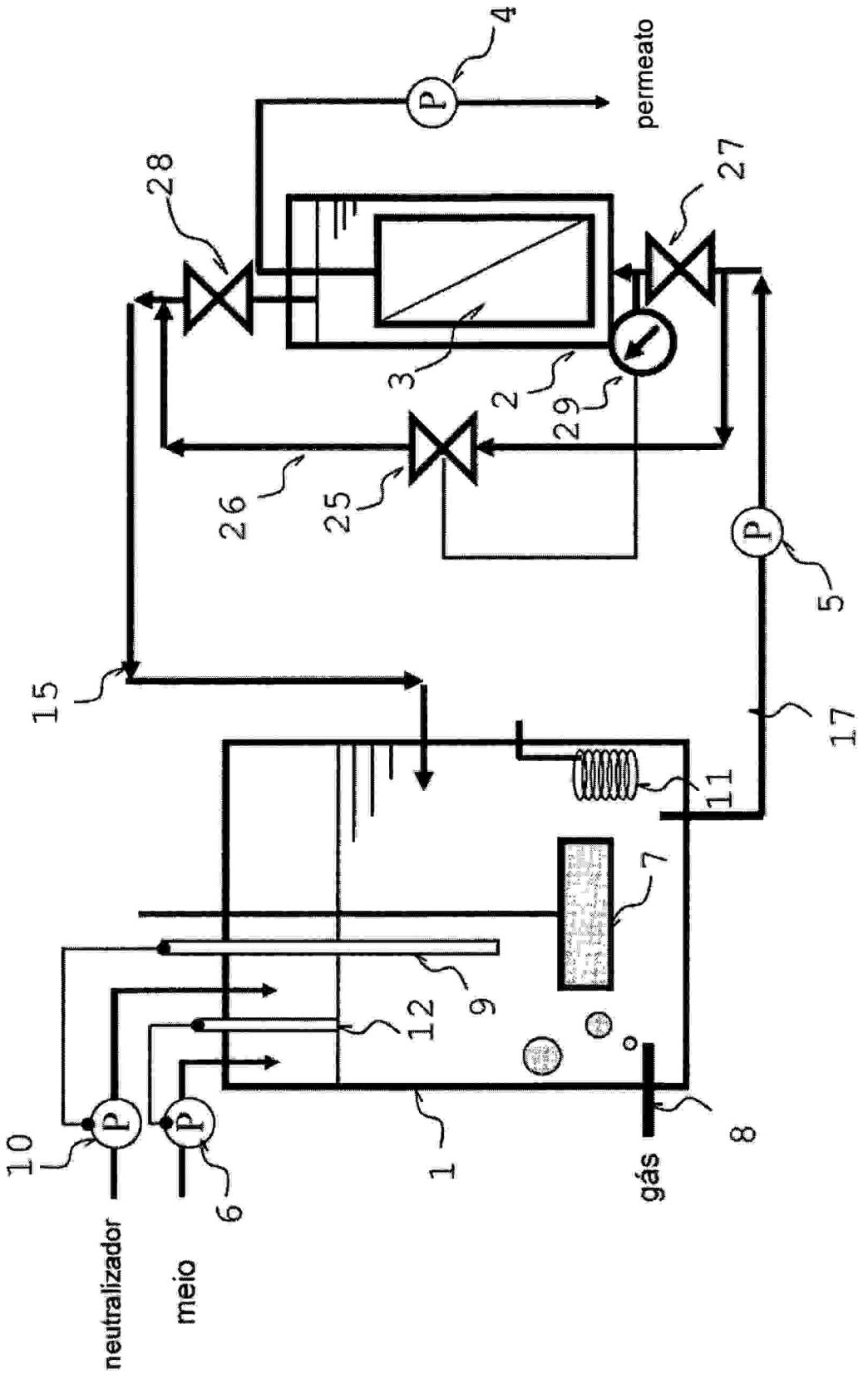

4
permeato
28
27
3
2
29
26
25
5
15
17
11
7
12
9
10
1
8
neutralizador
meio
6
gás

Fig. 14

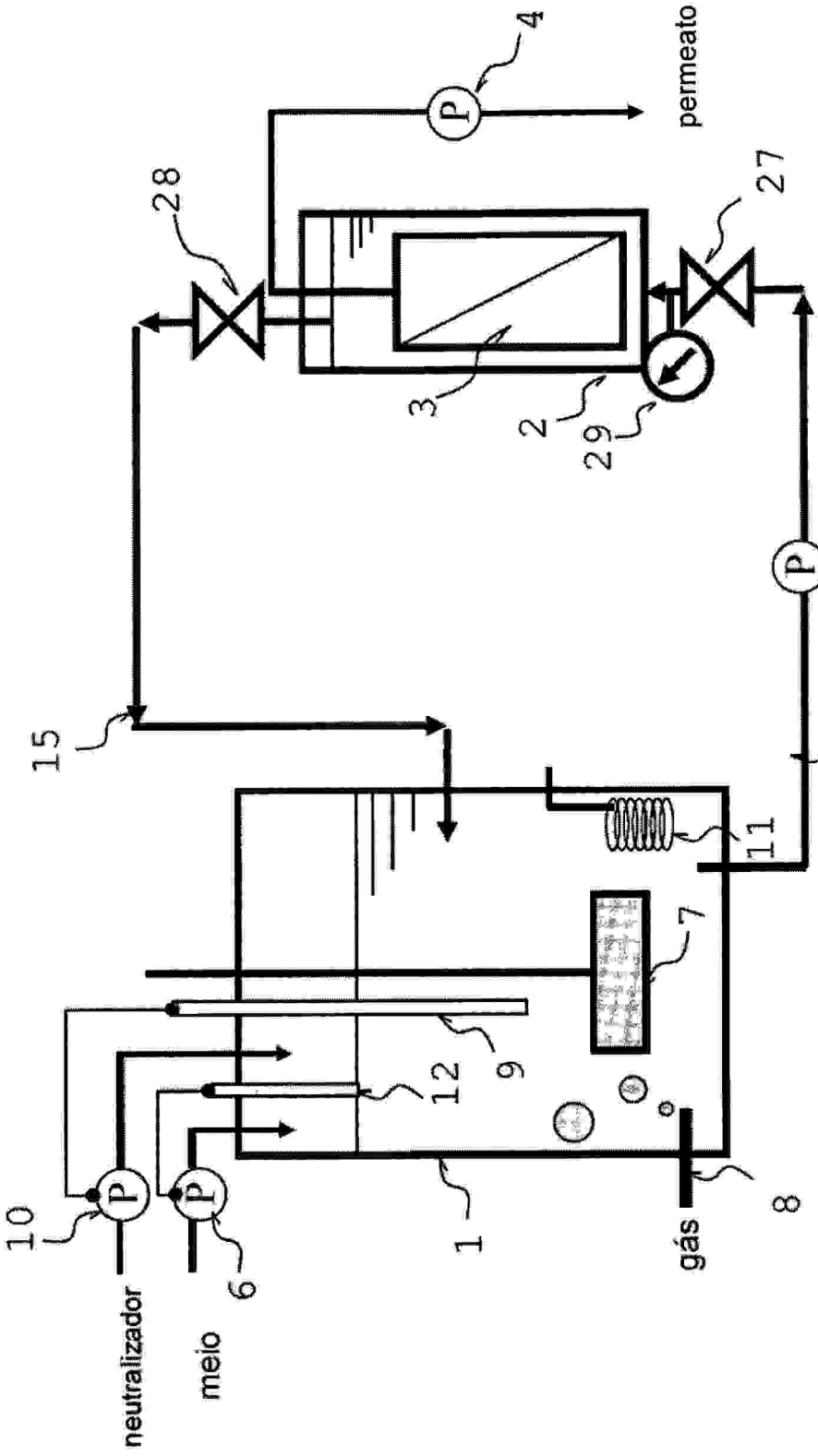

permeato
4
28
27
3
2
29
5
15
17
11
7
12
9
10
1
8
6
neutralizador
meio
gás

Fig. 15

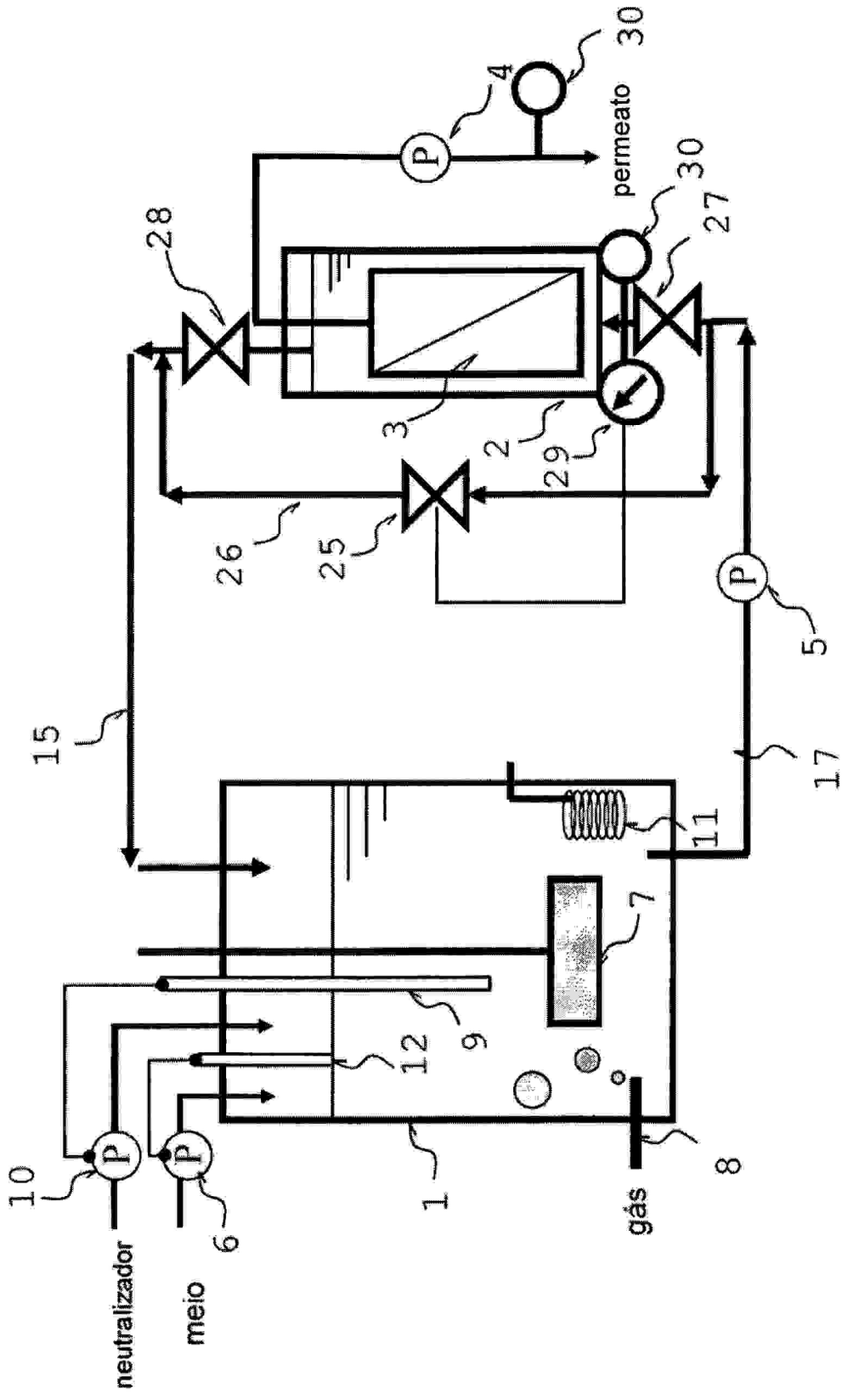

neutralizador
meio
gás
permeato
P
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
15
17
25
26
27
28
29
30

Fig. 16

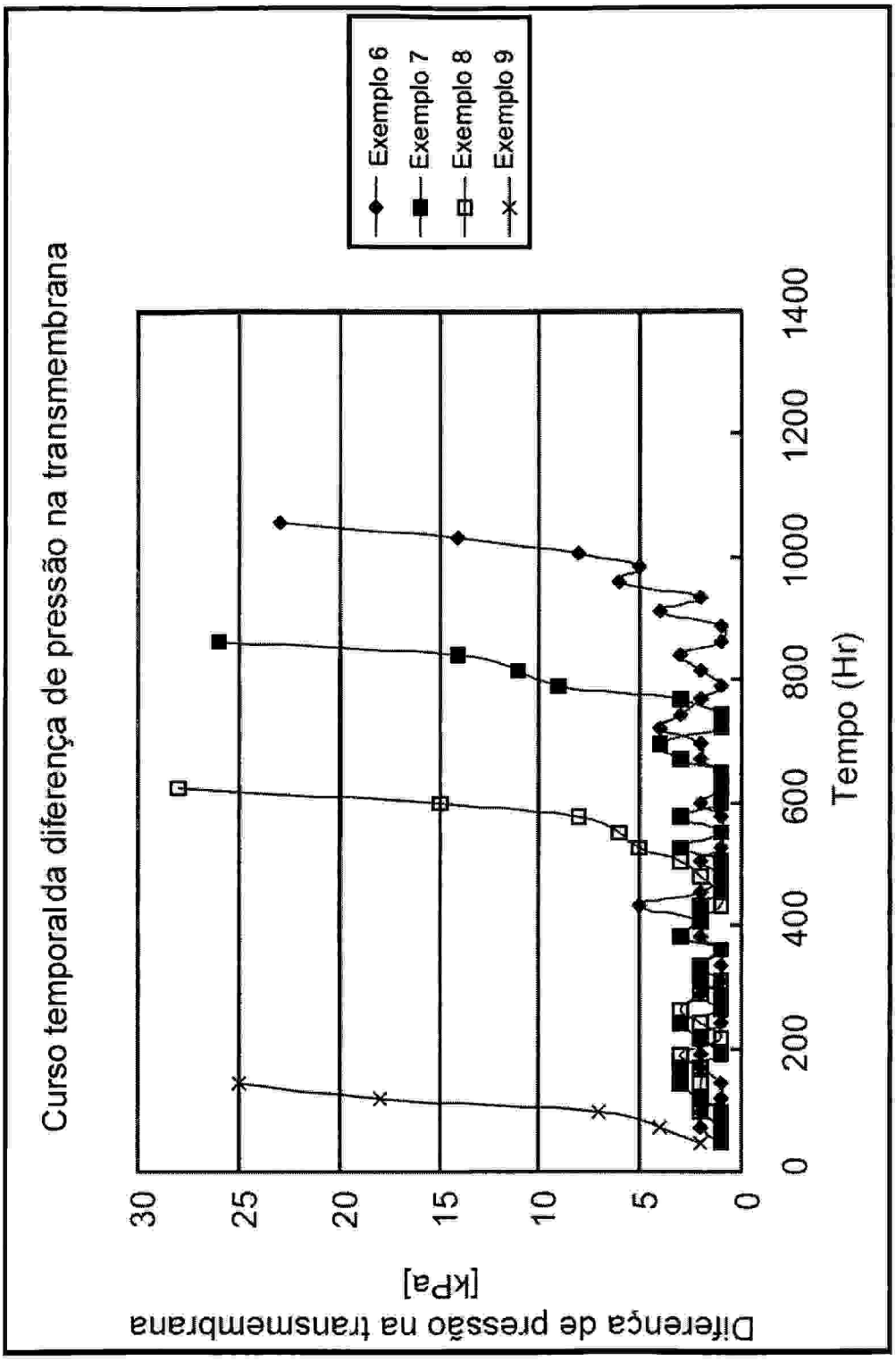

Curso temporal da diferença de pressão na transmembrana
Exemplo 6
Exemplo 7
Exemplo 8
Exemplo 9
Diferença de pressão na transmembrana [kPa]
0
5
10
15
20
25
30
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
Tempo (Hr)

Fig. 17

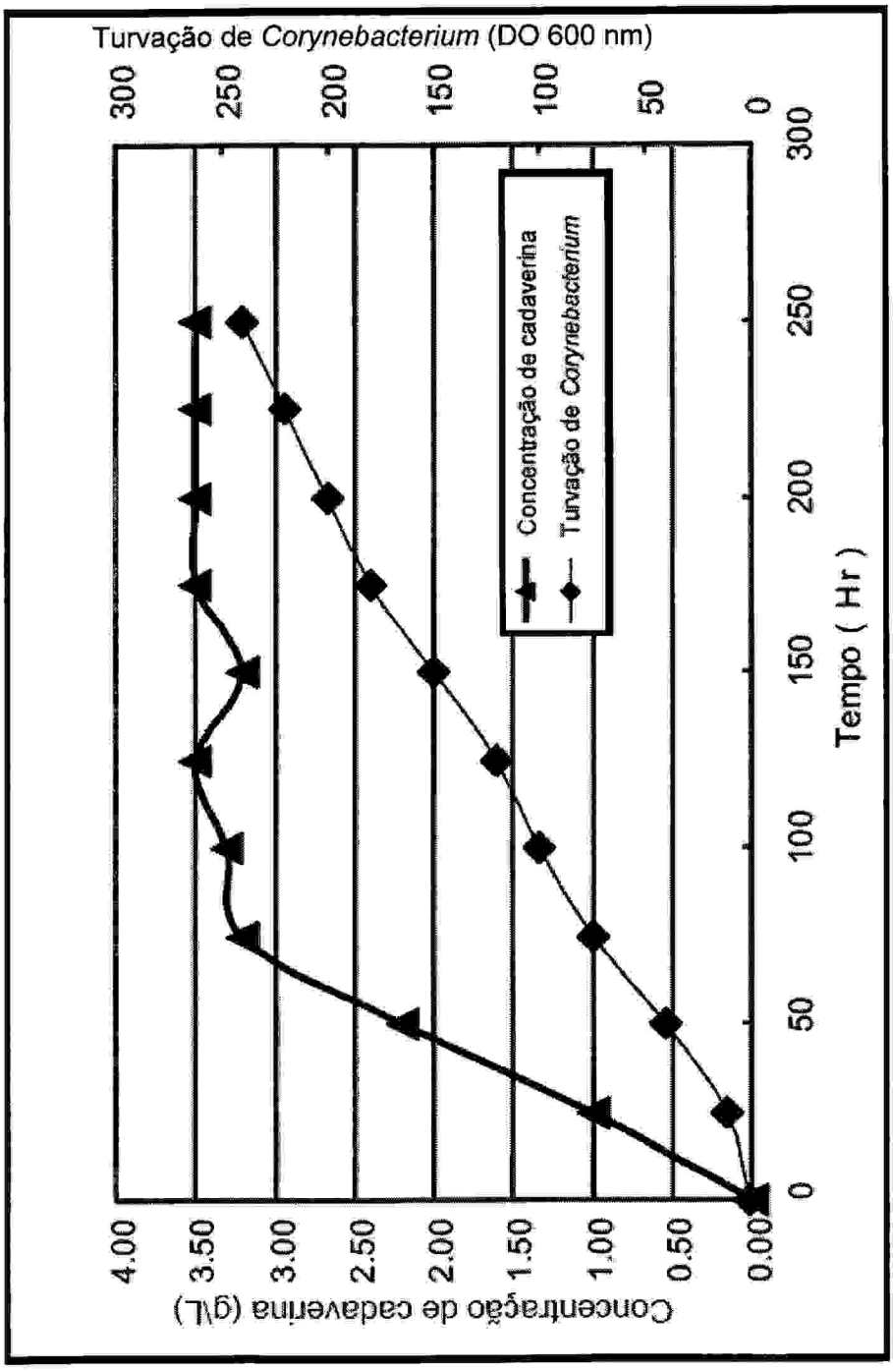

Turvação de *Corynebacterium* (DO 600 nm)
300
250
200
150
100
50
0
Concentração de cadaverina (g\L)
4.00
3.50
3.00
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
0
50
100
150
200
250
300
Tempo (Hr)
Concentração de cadaverina
Turvação de *Corynebacterium*

Fig. 18

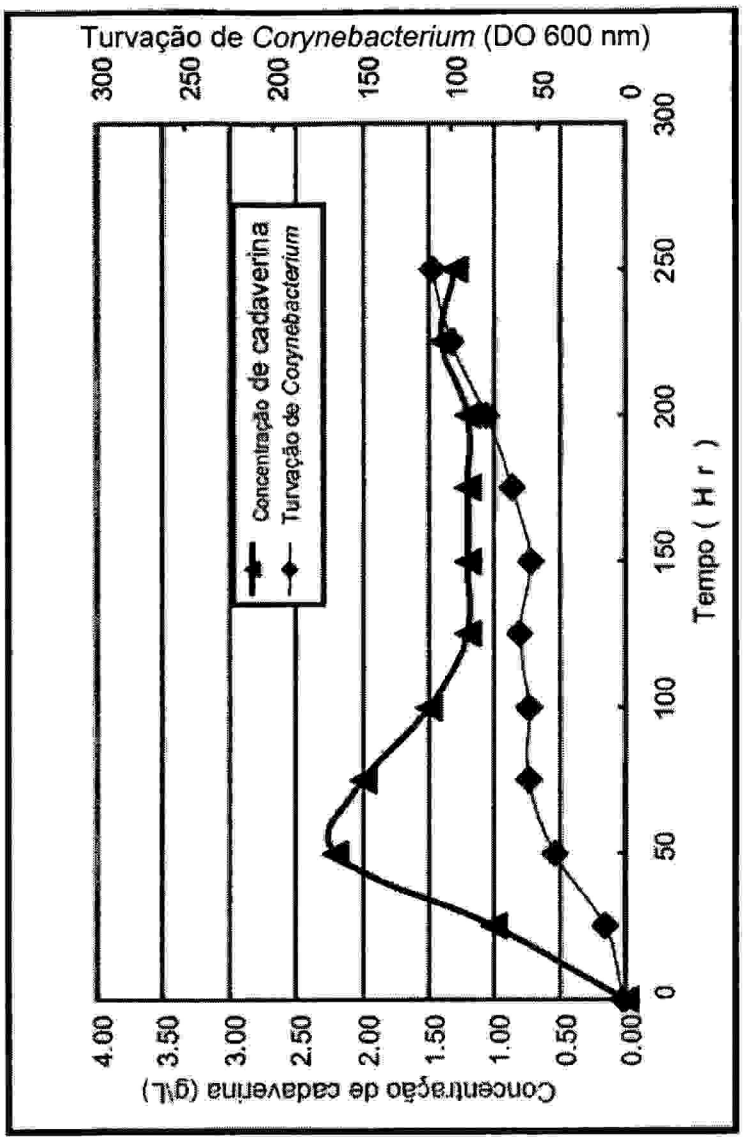

Turvação de *Corynebacterium* (DO 600 nm)
Concentração de cadaverina (g\L)
Tempo (H r)
Concentração de cadaverina
Turvação de *Corynebacterium*
4.00
3.50
3.00
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
300
250
200
150
100
50
0
0
50
100
150
200
250
300

Fig. 19

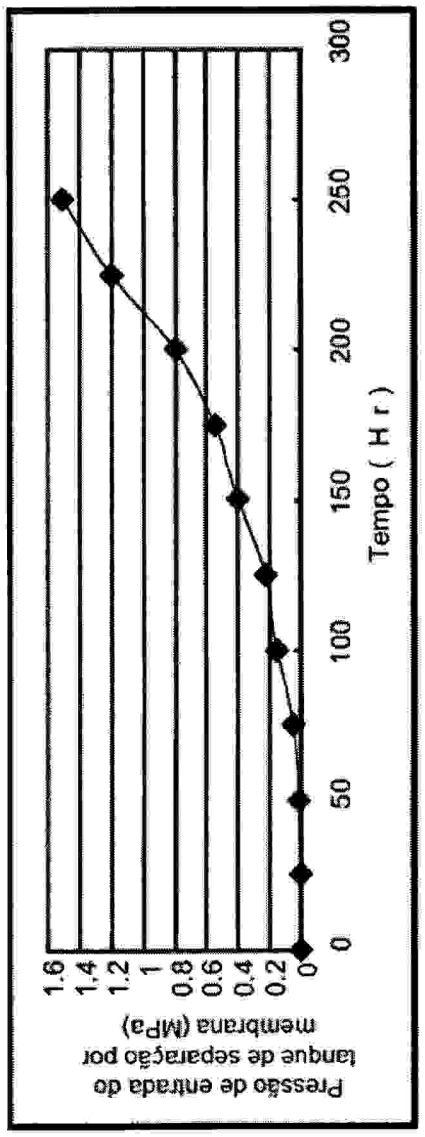

Pressão de entrada do tanque de separação por membrana (MPa)
Tempo (H r)
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
50
100
150
200
250
300

Fig. 20

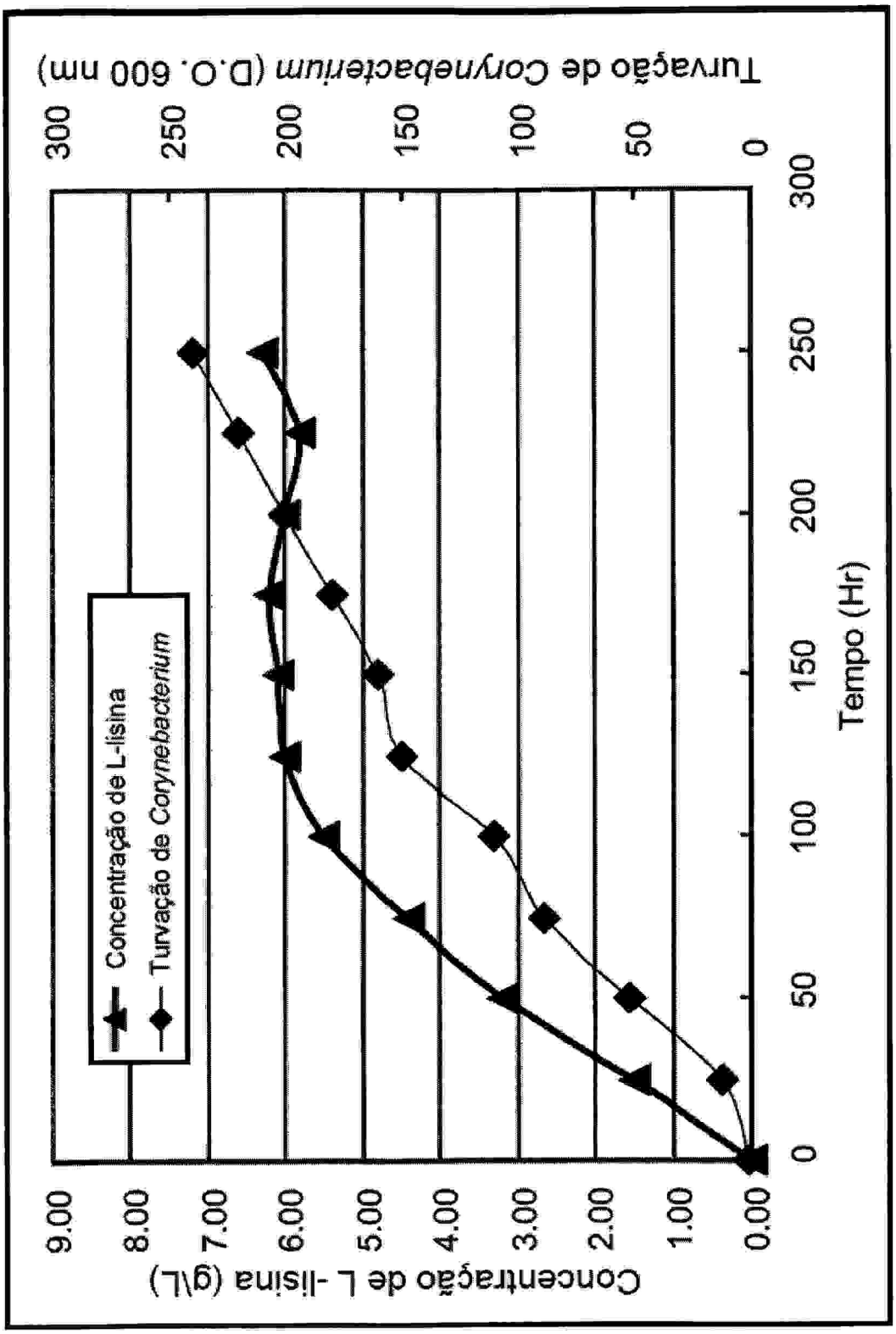

Concentração de L -lisina (g\L)
9.00
8.00
7.00
6.00
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
0
50
100
150
200
250
300
Tempo (Hr)
Turvação de Corynebacterium (D.O. 600 nm)
300
250
200
150
100
50
0
Concentração de L-lisina
Turvação de Corynebacterium

Fig. 21

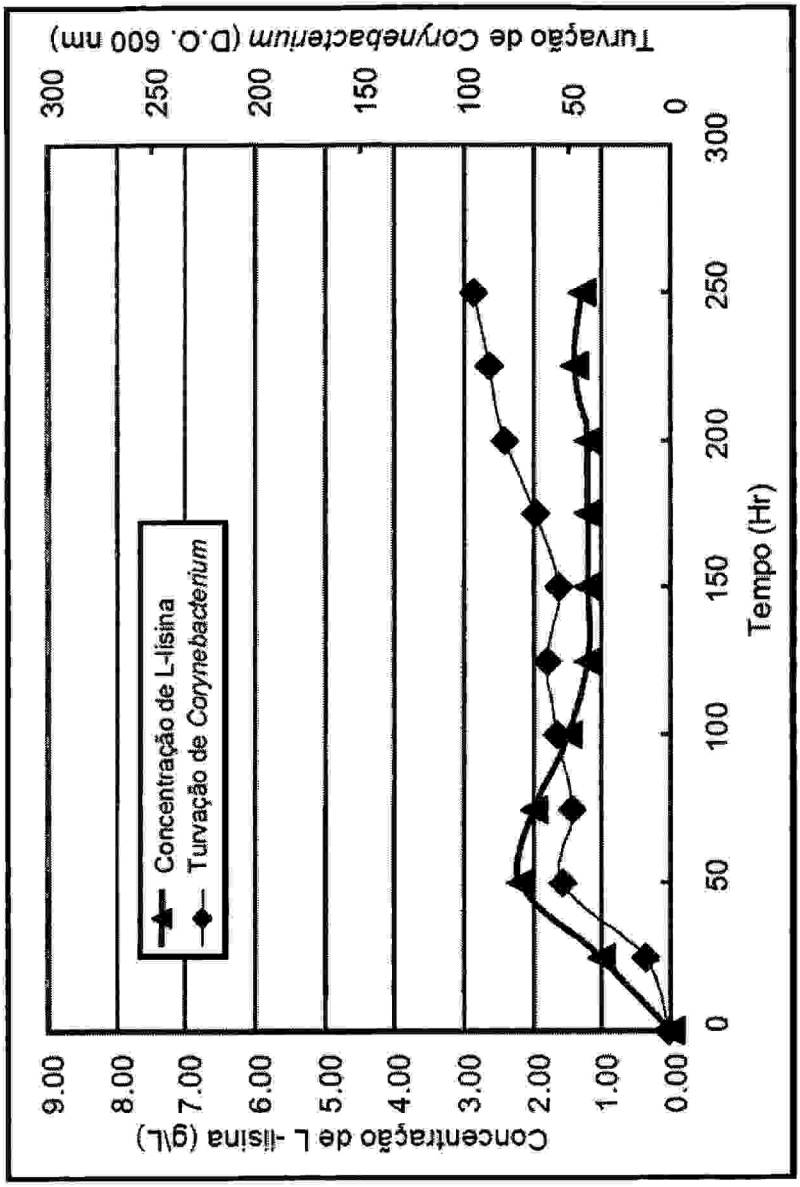

Concentração de L -lisina (g\L)
Turvação de Corynebacterium (D.O. 600 nm)
Tempo (Hr)
Concentração de L-lisina
Turvação de Corynebacterium
0.00
1.00
2.00
3.00
4.00
5.00
6.00
7.00
8.00
9.00
0
50
100
150
200
250
300

Fig. 22

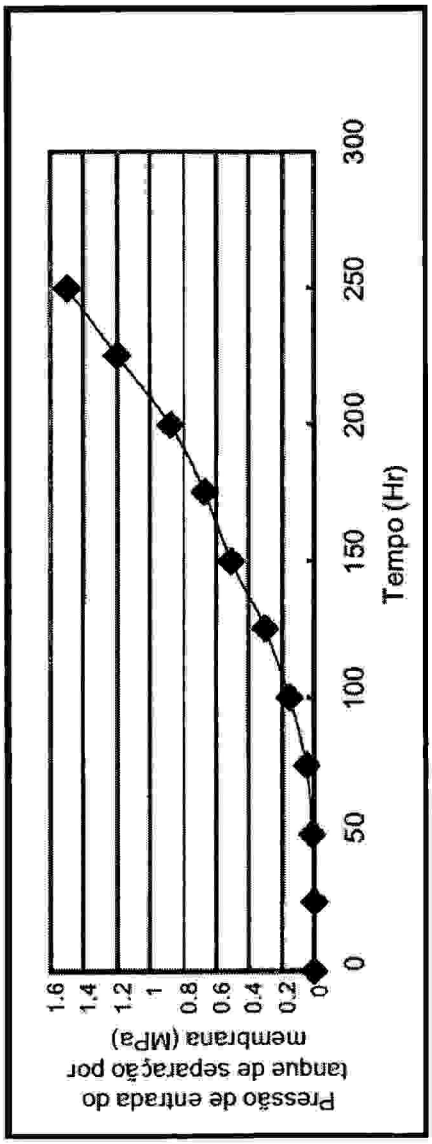

Pressão de entrada do tanque de separação por membrana (MPa)
Tempo (Hr)
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
1.4
1.6
0
50
100
150
200
250
300

Fig. 23

RESUMO

"MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UM PRODUTO QUÍMICO E APARELHO DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA"

A presente invenção está relacionada ao controle da velocidade de fluxo de um líquido de cultura no interior de um tanque de separação por membrana, sem influenciar as condições de cultura no tanque de fermentação, e também a impedir a precipitação de microrganismos ou de células em cultura, de modo tal que possa ser aumentada a eficiência de produção do produto químico em um método para a produção de um produto químico incluindo as etapas de: cultura de microorganismos ou células em cultura em um tanque de fermentação; transferência do líquido de cultura do tanque de fermentação para um tanque de separação por membrana, de modo a se filtrar o líquido de cultura através de uma membrana de separação; e coleta de um produto de fermentação de um líquido de filtração como produto químico, fazendo-se refluir o líquido de cultura que não foi filtrado para ser acrescentado ao líquido de cultura de um lado a montante do tanque de separação por membrana, faz-se desviar uma porção do líquido de cultura a ser transferido do tanque de fermentação do tanque de separação por membrana, dependendo de uma pressão do lado de influxo do líquido de cultura do tanque de separação por membrana.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

Código de Controle

Campo 1



17C89BE988869551

Campo 2



0A7B58DEE733D0B4

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 2012 07 31_0962-0022_Sequence Listing_LYY-CAN-EMG.txt
- Data de Geração do Código: 31-07-2012
- Hora de Geração do Código: 11:02:52
- Código de Controle:
    - Campo 1: 17C89BE988869551
    - Campo 2: 0A7B58DEE733D0B4